

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação da qualidade microbiológica e condições de
manuseamento de alimentos servidos em Escolas Básicas de
Lisboa, Portugal**

Andreia da Costa Figueiredo

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professora Doutora Deodália Dias
Mestre Pedro Teixeira

Dedicatória

Agradeço primeiramente a Deus, pois “tudo posso naquele que me fortalece” Filipenses 4:13

Agradeço aos meus pais e tia por sempre acreditarem em mim. Agradeço-lhes, igualmente, pelo incentivo e acompanhamento que me dedicaram ao longo de toda esta jornada. Sem o vosso apoio e incentivo nada teria sido possível.

À equipa do Laboratório de Bromatologia e Águas agradeço pela oportunidade de aprofundar conhecimentos e desenvolver novas competências- em especial ao Engenheiro Pedro Teixeira, à Engenheira Sílvia Costa e à Engenheira Carla Esteves por toda a paciência e disponibilidade.

À minha orientadora interna, Professora Doutora Deodália Dias, por todo o auxílio prestado e disponibilidade permanente no esclarecimento de todas as dúvidas que surgiram ao longo de todo o mestrado, em especial na decisiva fase de elaboração desta dissertação.

À Joana “Juh” e à Andreia “Dinozzo”, não poderia pedir por melhores colegas e amigas para estagiar, obrigada por toda a ajuda com as amostras, mas também por todos os momentos em que cantávamos em plenos pulmões e dançávamos.

À Beatriz, Jessica e Rhubia por aguentarem o meu mau humor, mas acima de tudo, pela ajuda quando o português já não fazia sentido.

Agradeço aos restantes amigos e família, pela constante preocupação e incentivos. Sem o vosso apoio tudo seria mais difícil.

Resumo

A presença de microrganismos como bactérias nos alimentos é inevitável. No entanto quando estes são patogénicos torna-se um problema tanto a nível económico como a nível de saúde pública. As bactérias são microrganismos bem-sucedidos na propagação de doenças e têm sido responsáveis por diversos surtos de intoxicação alimentar. Pelo facto de a contaminação poder ocorrer em qualquer parte do processo, desde a preparação até ao empratamento, ressalta a importância do cumprimento das práticas de higiene e segurança alimentar por partes dos manipuladores.

Por essa razão, o objetivo deste estudo foi avaliar a qualidade das refeições servidas e as condições de manuseamento em 69 Escolas Básicas de 1º ciclo sob gestão da Câmara Municipal de Lisboa, através de análises microbiológicas.

A amostragem deste estudo foi constituída por 72 amostras de alimentos, 107 amostras de zaragatoas de superfícies e 132 amostras de zaragatoas das mãos dos manipuladores, tendo sido pesquisados os parâmetros: *Salmonella spp*, Estafilococos coagulase positiva, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, microrganismos totais a 30°C e coliformes a 30°C.

Em relação aos resultados dos alimentos, foi detetada a presença de *Escherichia coli*, mas não houve deteção da presença de *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*. Quanto aos restantes parâmetros houve alguns valores não satisfatórios, mas na sua maioria os resultados foram satisfatórios. Estes valores foram obtidos por comparação com os valores descritos num guia redigido pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

Quanto às zaragatoas de superfície e das mãos dos manipuladores, a maioria das amostras apresentaram resultados satisfatórios relativamente aos valores estabelecidos a nível interno pela Câmara Municipal de Lisboa.

Palavras-chave: Contaminação || Bactérias || Qualidade Alimentar

Abstract

The presence of microorganisms in food is inevitable. However, when those microorganisms are pathogenic, it becomes a problem, both on an economic and public health level.

Bacteria are microorganisms that succeed fairly well in spreading disease and have been responsible for several food poisoning outbreaks. Given that contamination can occur during any part of process- since preparation to plating- following guidelines for hygiene practices and food safety by the manipulators is of the utmost importance.

For that reason, the objective of this study was to evaluate the quality of meals served in 69 Primary Schools managed by Lisbon Municipal Hall, through microbiological analysis.

The sample universe is constituted of 72 food samples, 107 surface swabs and 132 manipulators hands swabs, having the evaluation parameters been *Salmonella spp.*, coagulase positive *Staphylococcus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, total microbial count at 30°C and coliforms at 30°C.

Regarding the food results, it was detected the presence of *Escherichia coli*, however it was not detected the presence of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*. As for the other parameters there were some not satisfactory values, but for the most part, the results were satisfactory. These values were obtained by comparison to the stated values written in the guidelines of the Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge.

In terms of the surface and manipulators hands swabs, for the most part they presented results below the limits established internally by Lisbon Municipality.

Keywords: Contamination || Bacteria || Food Quality

Índice

Dedicatória	ii
Resumo	iii
Abstract	iv
Índice	v
Lista de quadros e figuras	vi
Lista de abreviaturas e siglas	vii
1-Introdução	8
1.1-Segurança alimentar e a importância bacteriana.....	8
1.2-Fatores que favorecem o crescimento microbiano.....	9
1.3-Parâmetros	11
1.4-Valores guias para avaliação da qualidade alimentar	15
2- Metodologias	18
2.1- Colheita de amostras	18
2.1.1- Laboratório de Bromatologia e Águas.....	19
2.2- Preparação das amostras: suspensão-mãe e diluições	19
2.3- Métodos de pesquisa	19
2.4- Contagem de microrganismos	22
3- Resultados.....	23
3.1- Enumeração e detecção de microrganismos nos alimentos	28
3.2- Controlo higio-sanitário de superfícies.....	35
3.3- Controlo higio-sanitáriodas mãos dosmanipuladores	35
4- Discussão	36
5-Conclusão	39
6-Referências Bibliográficas	41
7-Anexos	45
Anexo I- Tabelas dos resultados das análises dos alimentos	45
Anexo II- Tabelas dos resultados das análises das zaragatoas de superfícies e mãos dos manipuladores	48

Lista de quadros e figuras

FIGURAS

Figura 1.1- Fases do crescimento microbiano (Adaptada de Cowan, K., 2012).	10
--	----

GRÁFICOS

Gráfico 3.1- Qualidade das amostras dos alimentos (n= 72)	24
Gráfico 3.2- Qualidade das amostras dos alimentos no Grupo 1 (n=57)	24
Gráfico 3.3- Qualidade das amostras dos alimentos no Grupo 2 (n=5)	25
Gráfico 3.4- Qualidade das amostras dos alimentos no Grupo 3 (n=10)	25
Gráfico 3.5- Qualidade geral das amostras de acordo com o tipo de confeção (catering n=23; confeção local n=49)	26
Gráfico 3.6- Qualidade das amostras de acordo com o tipo de confeção no Grupo 1 (catering n= 20; confeção local n=37)	27
Gráfico 3.7- Qualidade das amostras de acordo com o tipo de confeção no Grupo 2 (catering n= 2; confeção local n=3)	27
Gráfico 3.8- Qualidade das amostras de acordo com o tipo de confeção no Grupo 3 (catering n= 1; confeção local n=9)	28
Gráfico 3.9- Pesquisa de Salmonella spp. nos alimentos (n=55)	28
Gráfico 3.10- Contagem de E.coli nos alimentos nos Grupos 1 e 2 (n=60)	29
Gráfico 3.11- Contagem de E.coli nos alimentos no Grupo 3 (n=9)	29
Gráfico 3.12- Contagem de Estafilococos coagulase positiva nos alimentos (n=72)	30
Gráfico 3.13- Contagem de microrganismos totais a 30°C no Grupo 1 (n=57)	31
Gráfico 3.14- Contagem de microrganismos totais a 30°C no Grupo 2 (n=5)	31
Gráfico 3.15- Contagem de microrganismos totais a 30°C no Grupo 3 (n=8)	32
Gráfico 3.16- Contagem de coliformes a 30°C no Grupo 1 (n=54)	33
Gráfico 3.17- Contagem de coliformes a 30°C no Grupo 2 (n=5)	33
Gráfico 3.18- Contagem de coliformes a 30°C no Grupo 3 (n=9)	34
Gráfico 3.19- Contagem de Listeria monocytogenes nos alimentos (n=62)	34

TABELAS

Tabela 1.1- Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a consumir Legenda: NA- Não aplicável (Adaptada de Santos e tal., 2005)	15
Tabela 1.2- Grupos de alimentos prontos a consumir (Santos et al., 2005)	16
Tabela 1.3- Parâmetros de avaliação máximos para zaragatoas de superfície e mãos de manipuladores (Adaptada de CML)	17
Tabela 2.1- Parâmetros a analisar de acordo com o tipo de amostra	19
Tabela 3.1- Resultados em percentagem das amostras das zaragatoas de superfície de acordo com os respetivos parâmetros	35
Tabela 3.2- Resultados em percentagem das amostras das zaragatoas de mãos dos manipuladores de acordo com os respetivos parâmetros	36
Tabela 6.1- Qualidade microbiológica das amostras de acordo com os parâmetros analisados	45
Tabela 6.2- Resultados das análises realizadas às zaragatoas das superfícies	48
Tabela 6.3 - Resultados das análises realizadas às zaragatoas dos mãos dos manipuladores	50

Lista de abreviaturas e siglas

AC- Agar Columbia
ALOA- Agar Listeria Ottavani&Agosti
AN- Agar Nutritivo
AP - Água Peptonada Tamponada
BP- Baird Parker
cm- Centímetro
CML- Câmara Municipal de Lisboa
CTV- Contagem de Totais Viáveis
DNA- Ácido desoxirribonucleico
EHEC-*E.coli* enterohemorrágica
EIEC-*E.coli* enterotoxigénica
EPEC- *E.coli* enteropatogénica
ETEC-*E.coli* enterotoxigénica
HACCP- Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
INSA- Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge
ISO- Organização Internacional de Normalização
MKTT- MullerKauffmann tetrationato / novobiocina
ml- Mililitro
NA- Não Aplicável
NP- Norma Portuguesa
OMS- Organização Mundial de Saúde
PCA- Plate Count Agar
RLM- Rapid L'mono
RPF- Fibrinogénio de Plasma de Coelho
RV- Rappaport Vassiliadis
SEs- Enterotoxinas Estafilocócicas
SFP- Intoxicação Alimentar Estafilocócica
SHU- Síndrome Urémica Hemolítica
SSA- *Salmonella Shigella* Agar
TBX- Tryptone Bile X-Glucurodine
TS- Triptona Sal
TSA- Tryptic Soy Agar
TSI- Triple Sugar Iron Agar
UFC- Unidade Formadora de Colónias
VRBG- Violet red bile glucose agar
VRBL- Crystal violet neutral red bile lactose
XLD- Xyloselysine deoxycholate Agar

1-Introdução

1.1-Segurança alimentar e a importância bacteriana

As doenças transmitidas por alimentos são responsáveis por causar morbidade e mortalidade, causando também perdas socioeconômicas em todo o mundo. De acordo com a estimativa de 2015, existem 31 principais riscos alimentares, que incluem principalmente bactérias, vírus e protozoários, que resultaram em cerca de 600 milhões de doenças transmitidas por alimentos e 420.000 mortes em 2010 (World Health Organization, 2015).

Com os progressos da sociedade e as alterações dos hábitos de consumo das populações ocorreu, consequentemente, um aumento na produção de uma maior variedade de alimentos, o que resultou numa cadeia alimentar mais longa e complexa. Além disso, o crescimento populacional mundial e a industrialização da agricultura colocam a segurança alimentar em risco face aos diversos desafios que esta enfrenta, pois, os procedimentos passam a exigir uma maior responsabilidade, tanto sobre os produtos, como por parte dos manipuladores dos mesmos. Em acréscimo aos fatores populacionais, as alterações climáticas também influenciam a segurança alimentar devido às mudanças da temperatura que irão afetar os procedimentos de produção, armazenamento e distribuição. Estes desafios ressaltam a importância da segurança alimentar, pois, episódios locais podem ser rapidamente disseminados para diversas regiões graças às trocas comerciais frequentes, tanto que na última década todos os continentes passaram por algum tipo de surto com relação a doenças transmitidas por alimentos (World Health Organization, 2017). Devido a estas preocupações foi adaptado a partir dos procedimentos criados para o programa espacial na década de 1970 nos Estados Unidos da América, um novo sistema para regulamentar a indústria de alimentos, Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle (HACCP). Este sistema abrange princípios que são mais sistemáticos e científicos focando-se na identificação, avaliação, controle e prevenção de riscos em todas as fases que envolvem a produção de alimentos (Cowan, K., 2012).

A contaminação dos alimentos pode acontecer em qualquer momento do processo, ou seja, na aquisição, no processamento ou na preparação dos mesmos. Os alimentos podem ser contaminados com microrganismos do solo, de animais e plantas, da água, do ar ou até por microrganismos presentes nos manipuladores de alimentos e utensílios. O nível de contaminação vai depender do tipo e quantidade de microrganismos e também se o alimento é cozinhado ou preservado. É impossível evitar por completo a transmissão de doenças através dos alimentos, pois os microrganismos estão presentes em todo o lado. No entanto a maioria das causas de intoxicações alimentares é devido ao crescimento de microrganismos nos alimentos. Os mecanismos de contaminação alimentar podem ocorrer de duas formas: por infecção alimentar, ou seja, é necessário que esteja presente uma dose infecciosa (células suficientes para iniciar a infecção) ou por intoxicação alimentar, para o qual é necessário que estejam presentes células suficientes para produzir a toxina (Cowan, K., 2012). Apesar de existirem diversas doenças infecciosas contraídas a partir de alimentos em determinadas circunstâncias, há doenças exclusivas ou predominantemente decorrentes do consumo de alimentos, como por exemplo a colite hemorrágica e a listeriose (Jay, J. M., 2005).

Abaixo estão descritos alguns casos de intoxicações alimentares que ocorreram nas duas últimas décadas. Em Outubro de 2006, nos Estados Unidos da América, 199 pessoas foram infetadas com uma estirpe de *E.coli*, pelo consumo de espinafres frescos. (Centers for Disease Control and Prevention, 2006). Deste surto resultaram três mortes. Entre Setembro de 2008 e Março de 2009, 714 pessoas, foram infetadas com uma estirpe de *Salmonella typhimurium* em 46 estados dos Estados Unidos da América. Este surto foi, causado pelo consumo de manteiga de amendoim (Centers for Disease Control and Prevention, 2009) e culminou em 9 mortes.

Na Europa, em países como Áustria, Dinamarca, Finlândia, Suécia e Reino Unido desde 2015 que ocorrem surtos de *Listeria monocytogenes* em milho, e outros vegetais congelados. Desde, junho de 2018 já foram notificados 47 casos, que conduziram a um total de 9 mortes (European Food Safety Authority, 2018). Entre 1 de maio e 12 de outubro de 2016, sete países europeus comunicaram casos de contaminação por *Salmonella enteritidis*, com os ovos como fonte de infecção, resultando em 112 casos confirmados e 148 prováveis (European Food Safety Authority, 2016).

Mais recentemente, alguns surtos alimentares têm sido atribuídos à *Escherichia coli*, envolvendo carne picada, com 18 pessoas infectadas nos Estados Unidos da América (Centers for Disease Control and Prevention, 2018). Na África do Sul ocorreu um surto de listeriose, que durou mais de um ano, com cerca de 674 indivíduos infectados e uma taxa de mortalidade de 23% (World Health Organization, 2018). Em França, em dezembro de 2017, foram confirmados 35 casos de *Salmonella*, em crianças com menos de seis meses, pelo consumo de fórmula infantil (World Health Organization, 2017).

1.2-Fatores que favorecem o crescimento microbiano

Os microrganismos são expostos a diversos fatores que influenciam o seu crescimento. Não só as características físicas e nutricionais do meio, mas também um conjunto de fatores ambientais como temperatura, pH e atividade da água, podem ter influência sobre o crescimento bacteriano (Húngaro et al., 2014). Para a maioria dos microrganismos, os fatores ambientais influenciam as funções das enzimas metabólicas. Assim, para que estes sobrevivam é necessário que os seus sistemas enzimáticos tenham a capacidade de se adaptar às alterações no habitat (Cowan, K., 2012).

Quando as condições se encontram favoráveis, dá-se o crescimento microbiano (Figura 1.1) e este pode ser dividido em quatro fases. A primeira é a fase lag (latência), que corresponde a um período em que a população de células não está a aumentar (crescer), no entanto as células individuais estão metabolicamente ativas à medida que vão aumentando o seu conteúdo e preparando-se para a divisão. A duração do período de latência varia de uma população para outra (Cowan, K., 2012). Na segunda fase (Fase Log) as bactérias reproduzem-se por fissão binária que, por ser um processo rápido leva a que o número de células aumente exponencialmente com o tempo. Esse crescimento varia entre espécies podendo ser um processo rápido, com um tempo mínimo de duplicação de 10 minutos, ou até vários dias. Por exemplo, no caso de *Escherichia coli*, caso o meio onde se encontra for favorável para o seu desenvolvimento, uma única célula pode gerar 10 milhões de células num período de 8 horas. Com o passar do tempo o crescimento abrande e fica estagnado (Fase estacionária) pois os nutrientes escasseiam e os produtos dos resíduos tóxicos acumulam-se. No entanto, a maior parte das células ainda não se encontra morta. Logo se forem diluídas em meio de crescimento novo, a fase de latência cessa e o crescimento exponencial é retomado. Se não houver uma renovação do meio ocorre, por fim, a morte celular (Fase de morte) (Cornelissen, N., Fisher, D., & Harvey, R. A., 2013).

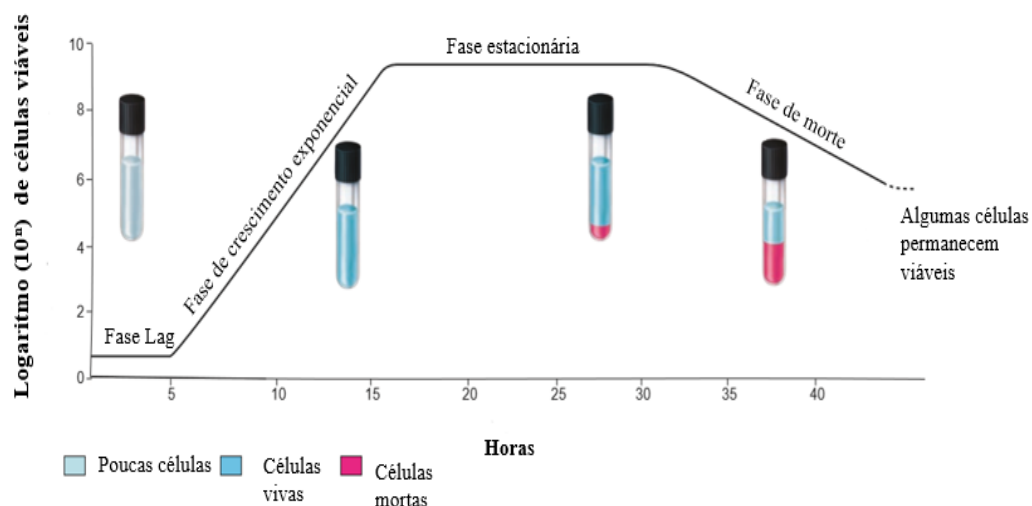


Figura 1.1- Fases do crescimento microbiano (Adaptada de Cowan, K., 2012).

Composição nutricional do meio

A nutrição é um processo no qual as substâncias químicas conhecidas como nutrientes são adquiridas do meio ambiente e usadas em diversas atividades celulares como metabolização, crescimento celular, função enzimática e na manutenção da estrutura proteica. Normalmente, os nutrientes necessários são a água, uma fonte de energia, uma fonte de azoto, vitaminas e sais minerais. Os principais elementos químicos essenciais para o crescimento das células são o carbono, o hidrogénio, o oxigénio, o fósforo, azoto e o enxofre. Os microrganismos podem obter os nutrientes de diversas formas, através de matéria inorgânica ou numa combinação entre matéria orgânica e inorgânica (Cowan, K., 2012).

Temperatura

De todos os fatores que influenciam o comportamento microbiano nos alimentos, a temperatura é o mais importante (Húngaro, et al., 2014). As células das bactérias não têm capacidade de controlar a temperatura, assumindo a temperatura ambiente do habitat onde se encontram inseridas. Assim a sua sobrevivência vai depender dessa adaptação. É possível dividir as bactérias em três grupos de acordo com a sua temperatura de crescimento: psicrófilos, mesófilos e termófilos. Os psicrófilos têm normalmente por habitat campos de neve, gelo polar e o oceano profundo e apresentam uma temperatura ótima inferior a 15°C, podendo mesmo crescer a 0°C. A maioria dos microrganismos são mesófilos, ou seja, crescem a temperaturas entre 20°C e 40°C. Este tipo de bactéria habita tanto em animais como plantas, assim como no solo e na água. Por fim, os termófilos, são bactérias que crescem a temperaturas superiores a 45°C (Cowan, K., 2012), podendo mesmo crescer a 122 °C, como por exemplo *Methanopyrus kandleri* (Wagner, I. D., & Wiegel, J., 2008). Normalmente habitam em solos e águas ligados a atividade vulcânica ou em habitats diretamente expostos ao sol (Cowan, K., 2012).

Presença de gases

Gases como oxigénio e dióxido de carbono podem ser fundamentais para o crescimento bacteriano. Em relação à presença de oxigénio é possível dividir os microrganismos em três grupos: microrganismos aeróbios, anaeróbios e anaeróbios facultativos. Um organismo aeróbio precisa do oxigénio gasoso para se desenvolver utilizando-o na respiração celular como aceitador terminal de

eletrões (respiração aeróbica). Um anaeróbio facultativo é um organismo capaz de agir como aeróbio na presença de oxigênio (Hogg, S., 2005), realizando a respiração aeróbica (Cowan, K., 2012), mas que tem também facilidade em sobreviver quando as condições se tornam anaeróbicas (Hogg, S., 2005), realizando a fermentação (Cowan, K., 2012). Um organismo anaeróbico obrigatório não possui enzimas metabólicas que lhe permitam utilizar o oxigênio na respiração (Cowan, K., 2012) usando a fermentação como principal modo de obter energia (Cornelissen, N., Fisher, D., & Harvey, R. A., 2013). Em condições laboratoriais, estes crescem em câmaras de anaerobiose onde o oxigênio é excluído de todos os meios líquidos e sólidos (Hogg, S., 2005).

Atividade da água

A atividade da água está relacionada com a quantidade de água disponível para as reações metabólicas dentro da célula. Se a atividade da água for reduzida vai causar stress osmótico (Húngaro et al., 2014). Normalmente as condições isotônicas não constituem muito stress para as células logo a sobrevivência vai depender do impacto dos ambientes hipertônicos e hipotônicos em que se encontram. A taxa a que a água se difunde da membrana celular para o citoplasma é constante, logo é necessário que as células se adaptem. Uma bactéria que habite num ambiente hipertónico necessita de restringir a perda de água para o ambiente ou aumentar a salinidade do ambiente interno. Quando num ambiente hipotónico, as células das bactérias vão sofrer turgescência logo a parede celular vai evitar que esta rebente (Cowan, K., 2012).

Uma vez que a maioria dos microrganismos funciona somente em certas faixas de atividade de água, se esta estiver fora da faixa ótima pode reduzir funções metabólicas essenciais da célula e inibir grande parte dos processos fisiológicos como a replicação de ácido desoxirribonucléico (DNA) e a absorção de nutrientes (Húngaro et al., 2014).

pH

Grande parte dos microrganismos apresenta um pH ótimo para crescimento de 6 a 8 uma vez que tanto ácidos como bases fortes podem interferir na atividade enzimática. No entanto, para além dos microrganismos que vivem em pH mais neutros, existem bactérias adaptadas a valores mais extremos, os acidófilos para pH ácido e os alcalinófilos quando o pH é alcalino (Cowan, K., 2012). Todos os microrganismos têm uma faixa de pH ideal para o seu crescimento e sobrevivência, sendo mais sensíveis às mudanças de pH internas do que externas, se essas mudanças forem significativas podem levar à perda de viabilidade (Húngaro et al., 2014).

1.3-Parâmetros

Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae é composta por bactérias Gram-negativas, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporos que se desenvolvem facilmente em peptona e extrato de carne. Esta família é constituída por membros geneticamente, e bioquimicamente, relacionados, mas ao mesmo tempo heterogêneos na sua variedade de hospedeiro, ecologia e risco de patogenicidade para o homem, animais e plantas. *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Salmonella*, *Shigella*, entre outros, são alguns dos gêneros pertencentes a esta família (Blood, R. M., & Curtis, G., 1995). É de ressaltar que as Enterobacteriaceae são utilizadas como indicadores do estado geral de higiene de um produto alimentar, pois caso se encontrem presentes em produtos que passaram por tratamentos térmicos

indica que ocorreu um cozimento inadequado ou contaminação pós-processamento (Center for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department, 2014).

Escherichia coli

Na década de 1940, certas estirpes de *Escherichia coli* (*E.coli*) passaram a ser designadas de patogênicas entéricas, logo, por essa razão *E.coli* é utilizada como indicadora de contaminação fecal e possível presença de patogênicos em alimentos e água. Desde a sua descoberta em 1885, *E.coli* é considerada uma bactéria Gram-negativa presente no trato intestinal de humanos, animais e aves de sangue quente. Em relação à sua morfologia apresenta a forma de bastonetes, móvel e não esporulada (Ray, B., 2004). Esta, é uma bactéria anaeróbia facultativa e que têm a capacidade de fermentar lactose, produzindo ácido e gás (Cornelissen, N., Fisher, D., & Harvey, R. A., 2013).

É possível diferenciar as estirpes de *E.coli* em relação aos seus antígenos somáticos (O), capsulares (K) e flagelares (H), (Doyle, M. P., & Buchanan, R. L., 2007). Existem estirpes de *E.coli* comensais que raramente causam doenças (Doyle, M. P., & Buchanan, R. L., 2007), no entanto existem algumas que causam diarreia e são divididas de acordo com os seus fatores de virulência, mecanismos de patogenicidade, serologia e quadro clínico (Doyle, M. P., & Buchanan, R. L., 2007). No que diz respeito aos principais tipos de infecções intestinais dividem-se em cinco: a) *E.coli* enteropatogénica (EPEC) que é responsável por causar diarreia em bebés, principalmente em locais com saneamento deficiente e normalmente a infeção ocorre no período perinatal; b) A *E.coli* enterotoxigénica (ETEC), também conhecida como a diarreia do viajante pois a transmissão ocorre pelo contacto com água e alimentos contaminados com resíduos humanos ou pelo contacto de pessoa a pessoa; c) A *E.coli* enteroinvasiva (EIEC), que causa uma síndrome semelhante à disenteria com fezes com sangue e febre; d) A *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) cujo gado é o seu reservatório principal, e que quando o hospedeiro é infetado com esta estirpe tem como sintomas diarreia constante com a presença de sangue (colite hemorrágica), causando também surtos de insuficiência renal aguda (síndrome urémica hemolítica ou SHU) que pode ser potencialmente fatal; e) Por fim, a *E.coli* enteroagregativa (EAEC) que causa também a diarreia do viajante e diarreia persistente em crianças pequenas (Cornelissen, N., Fisher, D., & Harvey, R. A., 2013).

A transmissão normalmente acontece por via fecal- oral, com alimentos e água contaminados que servem de veículos de transmissão (Cornelissen, N., Fisher, D., & Harvey, R. A., 2013), logo, para prevenir a contaminação deve ser praticado um saneamento adequado, cozinhar ou aquecer os alimentos a temperaturas apropriadas, refrigerar adequadamente os mesmos e prevenir contaminação cruzada (Ray, B., 2004).

Salmonella spp.

Salmonella pertence à família Enterobacteriaceae (Doyle, M. P., & Buchanan, R. L., 2007) e é o género com maior relevância na mesma (Jay, J. M., 2005). Em relação à sua morfologia apresenta-se em forma de bastonetes Gram-negativos móveis. É uma bactéria, anaeróbica facultativa com uma temperatura ótima de crescimento de 37°C sendo ainda, oxidase negativa e catalase positiva (Doyle, M. P., & Buchanan, R. L., 2007).

Os habitats de *Salmonella spp.* são os tratos gastrointestinais dos humanos e de outros animais selvagens e domésticos, estando, assim, amplamente distribuída no ambiente, incluindo no solo e água. A transmissão nos humanos ocorre normalmente de pessoa para pessoa ou entre animais e pessoas através da via fecal-oral, por ingestão do microrganismo presente em alimentos contaminados e inadequadamente cozinhados. A contaminação de alimentos com *Salmonella* não é detetada por alterações na sua aparência ou cheiro, logo, é importante que os produtores de alimentos e as indústrias processadoras tenham os devidos cuidados, para que não ocorram contaminações (Bell, C. & Kyriakides, A., 2001).

Para fins epidemiológicos é possível dividir as salmonelas em três grupos: as que infectam apenas seres humanos, como as *S. typhi* e *S. paratyphi* A e C, que são responsáveis pela febre tifoide e paratifoide, respectivamente, que são as doenças mais graves causadas por *Salmonella*; as adaptadas aos suínos (*S. choleraesuis*) e cavalos (*S. abortusequi*) e as que não possuem preferência em relação ao hospedeiro, sendo patogênicas para os humanos e animais. Este último grupo inclui a maioria dos sorotipos de origem alimentar (Jay, J. M., 2005).

As infecções causadas por *Salmonella* podem causar doenças tanto a nível intestinal como extraintestinal, sendo essas doenças gastroenterites, febre tifoide, entre outras. No caso das gastroenterites, que também podem ser conhecida como salmonelose, a infecção é causada principalmente por *S. enteritidis* e *S. typhimurium* e têm como sintomas característicos náuseas, vômitos e diarreia (com ausência de sangue). Estes desenvolvem-se normalmente após 48h do consumo dos alimentos ou água contaminados. A febre tifoide (ou entérica) é uma doença grave que pode ser fatal e é causada por *S. typhi*, com sintomas que variam entre suores, fraqueza, mialgia, diarreia, febre, entre outros. Tem um período de incubação que varia de 5 a 21 dias e quando não tratada tem uma taxa de mortalidade de cerca de 15%. Outro tipo de infecção que as salmonelas podem causar é a bacteremia que é frequentemente associada a infecções vasculares e a infecções abdominais, entre outras. Para as infecções acima descritas os grupos etários que apresentam maior risco, com sintomas mais severos, são o dos idosos e o das crianças (Cornelissen, N., Fisher, D., & Harvey, R. A., 2013).

Staphylococcus aureus

Os estafilococos são bactérias Gram-positivas pertencentes à família Micrococcaceae (Doyle, M. P., & Buchanan, R. L., 2007), que estão grandemente distribuídos no ambiente podendo habitar na pele e nas mucosas, tanto de humanos como animais. De todas as espécies *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é a mais patogênica, estando extremamente bem adaptada. Esta bactéria não necessita de condições nutricionais ou ambientes específicos, sendo uma bactéria oportunista, com a capacidade de se desenvolver em diversos alimentos e produzir fatores de virulência, assim como de desenvolver continuamente resistências. Todos estes fatores fazem com que seja um agente patogênico bem-sucedido (Baptista et al., 2016).

A nível de morfologia estas bactérias apresentam uma forma esférica e normalmente encontram-se agrupadas em cachos. Quanto tipo de respiração, são, organismos anaeróbicos facultativos (Cornelissen, C. N., Fisher, B. D., & Harvey, R. A., 2013). Os estafilococos estão completamente adaptados aos hospedeiros, com metade das espécies conhecidas tendo como hospedeiro principal os seres humanos. É possível encontrá-las perto de aberturas, na superfície do corpo, como por exemplo nas narinas anteriores (Jay, J. M., 2005), que são os principais nichos ecológicos de *S. aureus* (a colonização ocorre principalmente devido às mãos quando tocam em superfícies contaminadas) (Baptista et al., 2016), mas também em axilas e áreas inguinal e perineal (Jay, J. M., 2005).

A intoxicação alimentar estafilocócica (SFP) é uma das doenças alimentares mais comuns em todo o mundo, ocorrendo devido à formação de enterotoxinas estafilocócicas (SEs) nos alimentos (Paparella et al., 2018). Os sintomas da intoxicação podem fazer-se sentir entre 1 a 6 horas após a ingestão de alimentos contaminados, sendo os mais comuns as náuseas, vômitos, diarreia, dores abdominais, entre outros. Os sintomas duram de 24 a 48 horas, e a taxa de mortalidade por estafilococos é muito baixa ou até mesmo nula (Jay, J. M., 2005).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes é uma bactéria Gram-positiva, com morfologia de bastonetes, anaeróbica facultativa e capaz de produzir ácidos a partir da fermentação da glicose, não produzindo, no entanto gás. Pode ser encontrada tanto em ambientes naturais como artificiais. A sua capacidade de crescer a baixa temperatura e sem requerimentos nutricionais elevados faz com que seja uma colonizadora bem-sucedida tanto de alimentos como de equipamentos, resultando assim em contaminações cruzadas nos produtos alimentares dentro de fábricas (Jordan, K., & McAuliffe, O., 2018).

Na Europa, entre o período de 2008 a 2012 a listeriose foi a causa de morte mais frequente relacionada com o consumo de alimentos contaminados (Mateus, T., Maia, L., & Teixeira, P, 2014). Para além da transmissão de *Listeria monocytogenes* através do consumo de alimentos contaminados, esta também pode ocorrer pelo contacto com animais ou, no caso dos recém-nascidos, por infeção durante o parto. O período de incubação vai depender da dose ingerida e da suscetibilidade do indivíduo, sendo estimado que varia entre 24h a 91 dias. A nível de sintomas estes variam entre baixo risco e alto risco, no primeiro caso assemelham-se aos sintomas de gripe podendo, ou não, incluir vômitos e diarreia, nos casos mais graves podem desencadear meningite (infeção de tecidos que circundam o cérebro) e septicemia (infeção na corrente sanguínea) (Jordan, K., & McAuliffe, O., 2018).

Os grupos da população com o maior risco de contaminação abrangem os recém-nascidos, as mulheres grávidas, os idosos e os indivíduos imunodeprimidos. No caso das grávidas, como a imunidade celular é mínima, estas tornam-se particularmente suscetíveis a microrganismos intracelulares, (Mateus, T., Maia, L., & Teixeira, P, 2014) como *L.monocytogenes* que tem a capacidade de atravessar a barreira fetoplacentária (Jordan, K., & McAuliffe, O., 2018). Por esta razão, infeções por esta bactéria podem resultar em abortos, nados-mortos, corioamnionite, parto prematuro e septicemia materna e do feto (Mateus, T., Maia, L., & Teixeira, P, 2014).

Coliformes

Os coliformes são bactérias Gram-negativas em forma de bastonete, não esporuladas, anaeróbicas facultativas (Halkman, H., & Halkman, A., 2014) e capazes de fermentar lactose. Têm como habitat o trato intestinal, tanto de humanos como de animais, podendo ainda ser encontradas em ambientes aquáticos, solo, matéria fecal e vegetação (Colclasure et al., 2015).

As bactérias coliformes são consideradas organismos indicadores pois a sua presença nos alimentos indica que houve circunstâncias adequadas para a presença de bactérias entéricas o que pode significar que as condições sanitárias foram insuficientes (Halkman, H., & Halkman, A., 2014).

Em conjunto com *E.coli*, os coliformes são microrganismos preocupantes em quase todos os alimentos uma vez que uma elevada concentração de coliformes, e a presença de *E.coli* nos alimentos, geralmente refletem falhas de higiene durante o processo de produção, condições de armazenamento inadequadas e/ou contaminação pós-processamento (Keeratipibul, S., Techaruwichit, P., & Chaturongkasumrit, Y., 2009).

Contagem Microbiana Total

A contagem de células viáveis é um dos indicadores microbiológicos de qualidade dos alimentos mais genérico (Herrera A.G., 2001). Esta contagem faz-se num meio adequado de agar no qual uma célula viva ou algumas células vivas agrupadas podem desenvolver-se e crescer formando uma massa visível ao olho humano, normalmente com a morfologia de uma colónia redonda. Uma vez que uma colónia pode ser desenvolvida através de uma ou mais células individuais dá-se o nome de Unidade Formadora de Colónias (UFC). No entanto, saber apenas o número de UFC não é suficiente para a

análise da contagem microbiana total, é preciso relacioná-lo com o volume de um líquido (mL), o peso da matéria (g), a área de superfície (cm²) ou o volume de ar (cm³) (Fung, Y., 2009).

1.4-Valores guias para avaliação da qualidade alimentar

A legislação portuguesa é omissa em relação à maioria dos produtos prontos a consumir com exceção dos bolos e cremes de pastelaria, do leite e produtos à base de leite, entre outros. Por esta razão, e para abranger os alimentos prontos a consumir preparados em estabelecimentos de restauração coletiva, foi importante a definição de Valores Guia (Tabela 1.1) para a análise dos resultados analíticos. Ou seja, estabeleceram-se valores que permitem classificar o produto segundo níveis de qualidade/segurança. Os Valores Guia abaixo tabelados foram publicados pelo Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) (Santos et al., 2005).

Tabela 1.1- Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a consumir Legenda: NA- Não aplicável (Adaptada de Santos e tal., 2005)

Microrganismos	Grupo de Alimentos	Qualidade Microbiológica (UFC/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável/ potencialmente perigoso
Microrganismos a 30°	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$>10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$>10^6$	NA
Coliformes totais	1	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$>10^2$	NA
	2	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3$	Na
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$>10^4$	NA
<i>E.coli</i>	1, 2	<10	NA	≥ 10	NA
	3	≤ 10	$>10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria spp.</i>	1, 2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Patogénios					
<i>Staphylococcus coagulase positiva</i>	1,2 e 3	$<10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$>10^4$
<i>Salmonella spp.</i>	1,2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	1,2 e 3	Ausente em 25g	-	-	$\geq 10^2$

Ao longo dos anos o INSA obteve dados que permitiram agrupar os alimentos prontos a consumir em três grupos diferentes (Tabela 1.2), de acordo com o tipo de alimentos que entram na sua composição, tratamento térmico ou outro procedimento que é aplicado. Também, através da contagem de microrganismos aeróbios mesófilos, microrganismos indicadores e presença ou o número de determinados patogénicos foi possível estabelecer quatro níveis para avaliar a qualidade microbiológica. Estes dividem-se: 1) satisfatório, no qual os resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica; 2) aceitável, neste nível os resultados analíticos indicam que o produto se

encontra dentro dos limites estabelecidos; 3) não satisfatório, para quando os resultados analíticos indicam que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos e 4) inaceitável/potencialmente perigoso, onde os resultados analíticos indicam a presença de microrganismos patogénicos, ou toxinas, que poderão constituir um risco para a saúde. Este último resultado deve ser comunicado imediatamente à unidade de onde proveio o alimento, para que sejam tomadas as medidas que permitam corrigir a situação (Santos et al., 2005).

Tabela 1.2- Grupos de alimentos prontos a consumir (Santos et al., 2005)

Grupo	Produto	Exemplos
Grupo 1	Refeições/ Sandes/ Bolos/ Sobremesas doces com ingredientes totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, produtos UHT e de maionese industrializada.	Feijoada Pizza Bacalhau à Brás com salsa previamente processada Salada de batata com maionese industrial Pastéis de Bacalhau/ Croquetes/ Rissóis Sandes de carne assada Sandes de pâté de atum (maionese industrial) Omeleta de Queijo/ Fiambre Mousse de chocolate instantânea Bolo de chocolate Arroz doce com ou sem canela Gelatinas Salada de fruta/ fruta laminada em calda
Grupo 2	Refeições/ Sandes/ Bolos/ Sobremesas doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria	Salada de batata com tomate/alface Salada de feijão frade com atum, salsa e cebola picada ou molho vinagrete Prato de peixe/ carne/ ovos adicionais ou salada de vegetais ou frutos Bacalhau à Brás com salsa crua e/ou azeitonas Sandes com carne assada e alface Sandes de fiambre, queijo ou enchidos Mousse de chocolate Pudins com frutas ao natural Salada de fruta com calda adicionada de fruta ao natural
Grupo 3	Saladas/ Vegetais/ Frutos crus	Alface Tomate Cenoura Couve roxa Salada de frutas Fruta ao natural laminada Morangos

Para além do tipo de alimento, um dos fatores que influencia o nível de qualidade alimentar, é a maneira como estes são confeccionados, pois esta varia de acordo com as escolas.

O fornecimento das refeições escolares pode ser dividido em três tipos: catering a frio, catering a quente ou confeção local. No caso de o fornecimento ser por catering, as refeições são da responsabilidade de empresas e podem ser divididas em embalagens de unidose ou multidose; no caso da confeção local as refeições são confeccionadas nos refeitórios escolares com o objetivo de serem consumidas no próprio dia.

Quando o catering é a frio as refeições são preparadas de forma tradicional e transportadas em ambiente refrigerado em embalagens unidose. As embalagens são submetidas a um arrefecimento entre 1°C e 3°C e distribuídas em condições de refrigeração adequadas, sendo realizada a regeneração das refeições em questão já nos estabelecimentos de ensino. No catering a quente, as refeições são preparadas de forma tradicional e distribuídas em embalagens de multidose. As embalagens são arrefecidas rapidamente a temperaturas entre 1°C e 3°C, sendo, neste caso, a regeneração das refeições realizada ainda na fábrica. Após este processo, as refeições são distribuídas à temperatura adequada para o consumo. Uma vez que a refeição é servida às crianças nas embalagens, é o tipo de fornecimento menos manipulado (Câmara Municipal de Lisboa, n.d.).

Quanto às zaragoas de superfícies e de mãos de manipuladores (Tabela 1.3), os valores máximos para que os resultados sejam considerados satisfatórios e aceitáveis, foram estabelecidos por técnicos da Direção Municipal de Educação e Desporto da Câmara de Lisboa (fonte: CML).

Tabela 1.3- Parâmetros de avaliação máximos para zaragoas de superfície e mãos de manipuladores (Adaptada de CML)

	Superfícies	Mãos de manipuladores
Aeróbios mesófilos	<10 UFC/cm ²	<10 UFC/cm ²
Coliformes totais	<1 UFC/cm ²	<1 UFC/cm ²
<i>E.coli</i>	<1 UFC/cm ²	<1 UFC/cm ²
<i>S.aureus</i>	<1 UFC/cm ²	<1 UFC/cm ²

2- Metodologias

As práticas laboratoriais utilizadas para este estudo tiveram por base a ISO 7218:2007 “Microbiology of food and animals feeding stuffs- General requirements and guidance for microbiological examinations”. Para além desta norma foram também utilizadas as normas correspondentes aos parâmetros analisados. Os métodos descritos para a análise microbiológica de microrganismos podem ser divididos em quatro fases: processo de recolha e receção, preparação, análise das amostras e confirmação de colónias. Estes métodos foram aplicados tanto em zaragatoas de superfícies e mãos de manipuladores como nas amostras de alimentos.

2.1- Colheita de amostras

Para que as colheitas possam ser realizadas dentro dos parâmetros estipulados o processo de recolha de amostras regeu-se pela norma NP 1828:1982 “Colheita de amostras para análise microbiológica”. Nesta norma é referido que quer sejam recolhas de amostras de alimentos, zaragatoas ou água, todas devem ser realizadas de modo a manter todos os cuidados de assepsia, utilizando sempre material limpo e esterilizado, evitando assim possíveis contaminações. É também referido que, a roupa e as mãos do técnico responsável pela colheita devem estar desinfetadas e limpas. Durante a recolha, o recipiente onde se encontram os alimentos deve ser aberto o menos possível, respeitando os devidos cuidados de assepsia. Em relação às zaragatoas, para além dos pressupostos gerais descritos na norma referida anteriormente, estas foram recolhidas seguindo as normas descritas na ISO 18593:2004 “Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs”. Esta refere que, um cotonete de algodão com uma haste de madeira deve ser mergulhado num tubo de vidro com Solutio de Ringer e Tiosulfato de Sódio esterilizado. Refere ainda que, para a realização do esfregaço de superfícies e mãos, humedece-se a zaragatoa no líquido acima descrito, retira-se o excesso de líquido e realiza-se, o esfregaço passando a zaragatoa por toda a superfície a analisar com um movimento de semi-rotação. Após este procedimento, a zaragatoa é inserida no tubo que contém o diluente e no qual é partida a haste de modo a se fechar o tubo, mantendo assim as condições de assepsia. Tanto as amostras das zaragatoas como dos alimentos foram armazenadas e transportadas numa mala isotérmica mantendo temperaturas entre 0 e 4°C. Todas as amostras foram analisadas no mais curto espaço de tempo possível, evitando assim o desenvolvimento ou destruição de microrganismos antes da análise.

As recolhas de amostras decorreram em 69 escolas do Ensino Básico, tendo sido realizadas por engenheiras alimentares da Câmara Municipal de Lisboa (CML). As amostras alimentares consistiram normalmente em um ou dois alimentos, e para zaragatoas, em média foram recolhidas 5 amostras que tanto podiam ser do manipulador e/ou de superfícies, no caso das mãos de manipuladores a recolha de amostras foi realizada após consentimento informado. Com um total de 311 amostras. No laboratório, a receção das amostras foi realizada por uma engenheira responsável que tem o dever de verificar se o armazenamento e transporte das mesmas foi realizado conforme os parâmetros acima descritos. À chegada foi realizado o registo da amostra, detalhando a data e as horas de chegada, que tipo de amostra é (alimento ou zaragatoa), o número de amostra a ser atribuído, se a amostra veio conforme e a assinatura do responsável. Foi também elaborada uma folha de registo com a descrição de quais os parâmetros a analisar: pesquisa de *Salmonella spp*, contagem de *Estafilococos* coagulase positiva, contagem de *E.coli*, contagem da *Listeria monocytogenes*, contagem de microrganismos a 30°C e contagem de Coliformes a 30°C (Tabela 2.1). Após a receção as amostras foram levadas para a sala das tomas de modo a começar a análise o mais breve possível.

Tabela 2.1-Parâmetros a analisar de acordo com o tipo de amostra

Parâmetro	Alimento	Superfícies	Mãos
<i>Escherichia coli</i>	✓	✓	✓
Microrganismos a 30°C	✓	✓	✓
Coliformes totais	✓	✓	✓
<i>Staphylococcus aureus</i>	✓	X	✓
<i>Salmonella spp.</i>	✓	X	X
<i>Listeria monocytogenes</i>	✓	X	X

2.1.1- Laboratório de Bromatologia e Águas

Ativo desde 2012 como Laboratório de Bromatologia e Águas faz parte da Divisão do Ambiente e Energia da Câmara Municipal de Lisboa. O edifício abrange dois laboratórios: um dedicado a análises físico-químicas e outro a análises microbiológicas e é responsável pela monitorização da qualidade de águas de consumo, ornamentais, recreio, subterrâneas e residuais no Município de Lisboa, assim como de alimentos provenientes de cantinas escolares e refeitórios municipais.

2.2- Preparação das amostras: suspensão-mãe e diluições

Na sala de tomas foram preparados três tipos de tomas a partir de uma amostra, uma toma para a contagem de *Listeria monocytogenes*, uma para a pesquisa de *Salmonella* e uma para a suspensão-mãe. No caso da suspensão-mãe, com o auxílio de uma pinça estéril num saco de homogeneização esterilizado foram pesados 10g do alimento e 90g de Triptona Sal (TS) [VWR CHEMICALS], em condições de assepsia. De seguida o saco foi colocado no *Stomacher* (homogeneizador mecânico) de modo a obter uma solução homogênea.

Seguindo as diretrizes descritas na NP 3005:1985 “Preparação das diluições para análise microbiológica” após a realização da suspensão-mãe, mediu-se 1ml da suspensão-mãe (com uma concentração de 10^{-1}) para um tubo que continha o diluente esterilizado (9 mL) para uma concentração de 10^{-2} , agitando de seguida o tubo manualmente. A seguir realizou-se novamente o processo até se obter a diluição que continha por unidade de volume o número apropriado de microrganismos, neste estudo foram realizadas diluições até 10^{-3} e 10^{-5} , sempre com os duplicados.

2.3- Métodos de pesquisa

Pesquisa de *Salmonella spp.* em alimentos

Para a pesquisa de *Salmonella* utilizaram-se as metodologias padrão descritas na ISO 6579-2002 “Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*”, sendo este um dos procedimentos mais demorado pelo facto de existirem diversas fases. Foram testadas 55 amostras para *Salmonella spp.* (Tabela 6.1). Inicialmente foram pesados 25g da amostra e de seguida adicionou-se o meio de pré-enriquecimento, 225g de Água Peptonada Tamponada (AP) [Merck]. Foi de seguida efetuada uma incubação em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com uma

duração entre 16 e 24h. Após o período de incubação a amostra foi transferida para dois meios de enriquecimento seletivo, o meio RappaportVassiliadis (RAP) [VWR CHEMICALS] e o MullerKauffmantetratationato / novobiocina (MKTT) [VWR CHEMICALS]. Para o primeiro, foram pipetados 0,1mL da cultura anterior e colocado a incubar a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Para o segundo foi pipetado 1mL da mesma cultura e este foi colocado a incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Passado o período de incubação, a partir de cada um dos tubos acima referidos, foram semeadas com o auxílio de uma ansa descartável as superfícies de quatro placas, duas do meio Salmonella Shigella Agar (SSA) [Merck] e as outras duas de Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) [Merck]. Todas as placas foram colocadas a incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 20 a 24h. Caso tivesse ocorrido a formação de colônias características, teriam sido selecionadas pelo menos cinco colônias, de cada um dos meios seletivos. Relativamente ao meio, XLD, as colônias típicas de suspeita de *Salmonella* apresentam um centro negro e uma zona avermelhada levemente transparente. No que diz respeito ao meio, SSA, são transparentes e por vezes apresentam um centro negro. Se existentes, as colônias teriam sido repicadas para placas de Agar Nutritivo (AN) [BIO-RAD], após o que teria sido efetuada uma incubação em estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Para a confirmação bioquímica teriam sido realizados dois testes. Num deles é utilizado o meio Triple Sugar Agar (TSI) [Merck], para o qual são selecionadas colônias isoladas que são semeadas no meio com uma agulha de inoculação descartável, na rampa por estria e no fundo por picada. Este meio é colocado a incubar a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$.

As colônias típicas de *Salmonella*, em meio TSI, apresentam uma rampa vermelha (alcalina) e o fundo amarelo (ácido) com ou sem formação de H_2S (enegrecimento do meio). Outro teste que é realizado para a confirmação bioquímica é o teste da Ureia. Com o auxílio de uma ansa descartável retiram-se parte das colônias do meio AN e colocam-se as mesmas num tubo com ureia, que é incubado a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por $24\text{h} \pm 3\text{h}$. Se a reação for positiva a separação da ureia liberta amônia o que altera a cor do meio, caso a reação seja negativa o meio mantém-se igual e confirma-se a suspeita da bactéria. Se o teste da ureia for negativo realiza-se o teste da galeria de identificação API 20E [bioMérieux]. Este consiste em 20 microtubos que contêm substratos desidratados, que são inoculados com uma suspensão bacteriana que reconstitui os testes. As reações obtidas durante o período de incubação refletem-se na mudança espontânea de cor, ou são reveladas através da adição de reagentes. A leitura dos resultados é realizada com o auxílio do Quadro de Leitura e a identificação obtém-se com o Catálogo Analítico ou programa e identificação. Em caso de necessidade de confirmação serológica, as amostras são enviadas para o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA) onde é realizado o teste de aglutinação.

Contagem de Estafilococos coagulase positiva em alimentos

Para a pesquisa de estafilococos coagulase positiva utilizaram-se as metodologias padrão descritas na NP 4400-2 2002 “Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies)”, a qual especifica a técnica sem confirmação de colônias. Esta é uma técnica relativamente rápida pois no espaço de 24h é possível saber se temos presença ou ausência de estafilococos. Para estafilococos coagulase positiva foram testadas 72 amostras. A partir da amostra foi realizada uma suspensão-mãe para a qual foram pesados 10g da amostra e 90g de TS, sendo seguidamente realizadas diluições decimais sucessivas até à diluição 10^{-3} .

Foi colocado 1 mL de suplemento Fibrinogénio de plasma de Coelho (RPF), previamente re-hidratado com água estéril, em placas de Petri e de seguida foi adicionado 1mL da amostra em cada uma das caixas de Petri de acordo com a respetiva diluição (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}). A seguir foram adicionados 9 ml do meio de cultura Baird Parker (BP) [Merck], agitou-se de modo a que o meio de cultura incorporasse o inóculo e deixou-se solidificar. Após isto as placas invertidas foram colocadas a incubar na estufa a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $48\text{h} \pm 4\text{h}$. As colônias características foram marcadas nas placas

às 24h de incubação. Após o período estipulado foi realizada a contagem de colónias características, as quais se apresentam negras ou cinzentas, brilhantes e convexas, rodeadas de um halo claro.

Contagem de *E.coli* em alimentos

Para a contagem de *E.coli* utilizaram-se os métodos descritos na NP 4396: 2002 “Regras Gerais para Contagem de *E.coli*”. Para esta bactéria o processo também é relativamente rápido durando cerca de um dia. Para *E.coli* foram testadas 69 amostras. A partir da amostra foi realizada uma suspensão-mãe para a qual foram pesados 10g da amostra e 90g de Triptona Sal (TS) [VRW CHEMICALS], tendo, seguidamente, sido realizadas diluições decimais sucessivas até à diluição 10^{-3} . Foi colocado, em cada uma das respectivas placas de Petri, 1 ml da amostra, de acordo com as diluições e de seguida, adicionados 15 mL do meio de cultura Tryptone Bile X-Glucurodine (TBX) [Merck]. Agitou-se e deixou-se solidificar. Após a solidificação do meio, as placas foram incubadas invertidas a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 18 a 24h. Após o período de incubação procedeu-se à contagem de colónias características de *E.coli*, que se apresentam azuis. Só foram contadas as placas que continham até 150 colónias características (limite superior de deteção) e/ou não características.

Contagem de Coliformes a 30°C em alimentos

Na contagem de coliformes a 30°C utilizaram-se os métodos descritos na NP 3788: 1990 “Regras Gerais para Contagem de Coliformes a 30°C ”, demorando todo o processo cerca de 24h. Em relação aos coliformes a 30°C foram testadas 68 amostras. A partir da amostra recolhida foi realizada uma suspensão-mãe para a qual foram pesados 10g da amostra e 90g de TS, e foram realizadas diluições decimais sucessivas até à diluição 10^{-3} . De acordo com as respetivas diluições, foi colocado 1mL da amostra em cada uma das placas de Petri, previamente identificadas. De seguida colocaram-se 15mL do meio de cultura Crystal violet neutral red bile lactose (VRBL) [VWR CHEMICALS], agitou-se e deixou-se solidificar. Quando já sólido adicionaram-se mais 4 mL do mesmo meio de cultura na superfície do meio semeado, e deixou-se novamente solidificar, este procedimento é realizado de modo a criar uma atmosfera de anaerobiose.

Terminado o processo colocaram-se as placas invertidas a incubar a 30°C durante 24 ± 2 h. Em caso de presença, contaram-se as colónias características de coliformes, que se apresentam com uma cor violácea. Só foram consideradas as placas que continham até 150 colónias características e/ou não características.

Contagem de *Listeria monocytogenes* em alimentos

A norma 11290-2:1998/2004 “Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*” descreve as metodologias padrão para a contagem de *Listeria*, para a qual foram testadas 62 amostras. Para preparar a suspensão inicial foram colocados 25g de amostra em 225 de Fraser $\frac{1}{2}$ [VWR CHEMICALS]. Após a preparação, a suspensão foi colocada a incubar a 20°C por 1h, para revivificar. Passado esse tempo, com uma micropipeta esterilizada transferiu-se $1\mu\text{L}$ da suspensão inicial para a superfície de uma placa com meio Agar Listeria Ottavani & Agosti (ALOA) [BIO-RAD] e outro microlitro para a superfície de uma placa com meio Rapid L'mono [BIO-RAD]. Os inóculos na superfície do meio com um espalhador esterilizado. De seguida, para assegurar uma atmosfera pobre em oxigénio e rica em dióxido de carbono, utilizou-se o kit de Anaerocult C mini [Merck]. Assim as duas placas de Petri acima descritas foram colocadas num saco de incubação, juntamente com um pacote de Anaerocult C mini previamente humedecido com 3ml de água destilada. O saco foi fechado e colocado a incubar de 35 a 37°C . Fez-se uma leitura às 24h e uma segunda leitura às 48h.

No caso da presença de colónias características estas apresentam, no caso da placa com meio ALOA uma cor verde-azulada com um halo opaco e no caso da placa com o meio Rapid L'mono, uma

cor azul. Contaram-se apenas as placas com um número total de colónias inferior a 150. Casose tivesse obtido colónias típicas de *Listeria* selecionar-se-iam 5 colónias de cada um dos meios seletivos e dos respetivos duplicados e semear-se-ia por estria, com o auxílio de uma ansa descartável, no meio de cultura Tryptic Soy Agar (TSA) [Merck], previamente seco. Por fim incubar-se-ia a 35-37°C durante 18 a 24h. As colónias típicas de *Listeria* no meio TSA são convexas, translúcidas, incolores, regulares e com um diâmetro de 1 a 2mm. Depois da incubação, para confirmação ter-se-ia realizado a reação de catalase (+) e a reação hemolítica. Para este último teste repicam-se as colónias características TSA catalase (+) [Merck] para placas de Agar Columbia (AC) por estria com uma ansa descartável e incubam-se as mesmas a 35-37°C durante 24 ±2h. A confirmação bioquímica é feita através da Galeria de Identificação API Listeria [bioMérieux]. Esta comporta 10 microtubos que contêm os substratos desidratados e permitem a realização de testes enzimáticos ou fermentações de açúcares. As reações produzidas durante o período de incubação traduzem-se pelas mudanças espontâneas de cor ou são reveladas através da adição de reagentes. A leitura destas reações é efetuada com o Quadro de Leitura e a identificação obtém-se consultando a lista dos perfis do folheto informativo ou com um sistema de identificação.

Contagem de microrganismos a 30°C em alimentos

A norma 4833: 2003 “Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of microorganisms- Colony-count technique at 30 °C” descreve a técnica para contagem de microrganismos a 30°C. No que diz respeito aos microrganismos a 30 °C foram testadas 70 amostras. A partir da amostra foi realizada a suspensão-mãe para a qual foram pesados 10g das amostras e 90g de Tripton Sal (TS) e foram realizadas diluições decimais sucessivas até à diluição 10⁻⁵ com ensaios em duplicado. Foi colocado em cada uma das respetivas placas de Petri, 1 mL da amostra, de acordo com as diluições, de seguida adicionaram-se 15 mL do meio de cultura Plate Count Agar (PCA) [Merck], agitou-se e deixou-se solidificar. As placas foram incubadas invertidas a 30°C ± 1°C, durante 72h ± 3h. Passado o período estipulado procedeu-se à contagem de colónias. E só foram consideradas as placas que continham no máximo 300 colónias.

Zaragatoas

Segundo a norma 18593:2004 “ Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs”, a zaragatoa é colocada num tubo com soluto de Ringer e Tiosulfato de Sódio e é analisada em duplicado segundo os procedimentos descritos. Após a agitação manual dos tubos, é colocado 1mL da amostra em cada uma das placas de Petri, sendo de seguida realizados os mesmos procedimentos que foram descritos para os alimentos. Distribuem-se os meios de cultura de acordo com os parâmetros a ser analisados, deixa-se solidificar e por fim invertem-se as placas. As placas inoculadas são colocadas a incubar de acordo com o tempo e temperatura do meio de cultura. Após o período de incubação, procedeu-se à contagem das colónias típicas. A tabela 2.1 demonstra quais os tipos de parâmetros que são utilizados pela CML para analisar as zaragatoas.

2.4- Contagem de microrganismos

De acordo com a norma 7218:2007 “Microbiology of food and animals feeding stuffs- General requirements and guidance for microbiological examinations”, quando se avalia a qualidade/segurança de um alimento normalmente não é suficiente apenas saber quais os microrganismos que estão presentes sendo, na maioria dos casos, igualmente importante determinar a

quantidade dos mesmos e por essa razão, é necessário enumerar os microrganismos. Neste estudo apenas foram realizadas contagens em meios sólidos.

Alimentos e zaragatoas

Ainda de acordo com a norma acima referida, cada uma das análises de enumeração de microrganismos nos alimentos deve ser efetuada, e analisada, a partir da suspensão-mãe da amostra de modo a obter colónias contáveis. Após a realização dos procedimentos descritos no capítulo 2.3 é feita a contagem do número total de colónias características através da seguinte equação geral (1):

$$N = \frac{\sum C}{V \times 1,1 \times d} \quad (1)$$

Sendo: $\sum C$, a soma das colónias contadas em duas placas contendo duas diluições sucessivas da amostra (nos duplicados é necessário primeiro fazer a média aritmética de cada diluição); V, o volume do inóculo em cada placa em mililitros; d, é a diluição correspondente à primeira diluição selecionada. O resultado é apresentado por mililitro nos produtos líquidos ou por grama para os restantes produtos.

Em relação às zaragatoas conforme a norma 18593:2004 “ Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs”, para se realizar a contagem das colónias típicas por cm² de superfície a analisar (N_s) utiliza-se a seguinte equação (2):

$$N_s = \frac{N \times F}{A} \times D \quad (2)$$

No qual, N corresponde ao número de UFC em 1mL de diluente, F a quantidade em mL de diluente no tubo, A a área da superfície a ser avaliada em cm² e D a diluição considerada

3- Resultados

Os resultados apresentados neste estudo dizem respeito a análises efetuadas no período de março de 2015 a maio de 2018, sendo portanto algumas delas não abrangidas no período correspondente ao estágio curricular na CML, que decorreu entre Outubro de 2017 e Maio de 2018. Durante o período do estágio, obteve-se maioritariamente uma amostra por escola, no entanto houve casos em que num mesmo dia foram recolhidas duas amostras, perfazendo um conjunto de 72 amostras de alimentos.

Das Escolas Básicas cuja gestão é da responsabilidade da CML, 69 foram incluídas neste estudo. O total de dados para este estudo foi 311 amostras das quais 72 são amostras de alimentos (Tabela 6.1), 107 amostras de zaragatoas de superfícies (Tabela 6.2) e 132 amostras de zaragatoas provenientes das mãos dos manipuladores (Tabela 6.3).

Das 72 amostras dos alimentos analisadas (Gráfico 3.1) cerca de 60% apresentam resultados satisfatórios e 22% aceitáveis, porém, cerca de 18% das amostras apresentam resultados não satisfatórios no que diz respeito à qualidade das amostras. Os valores limite de referência utilizados para determinar a qualidade das amostras foram os estabelecidos pelo INSA no manual de Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a consumir (Tabela 1.1).

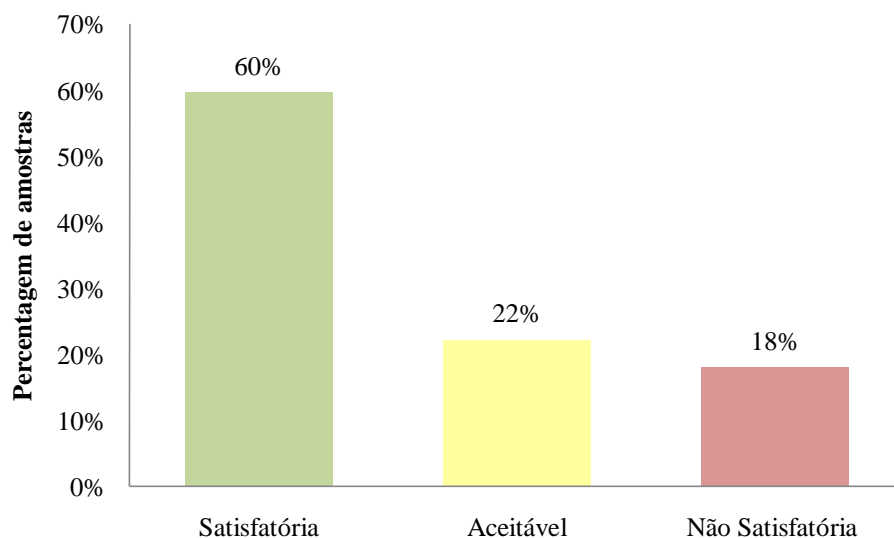


Gráfico 3.1- Qualidade das amostras dos alimentos (n= 72)

Uma das questões colocadas ao longo deste estudo era verificar a existência de uma discrepância entre a qualidade microbiológica dos alimentos totalmente cozinhados (Grupo1) que engloba 57 amostras, alimentos cozinhados com adição de ingredientes crus (Grupo 2), com 5 amostras e alimentos totalmente crus (Grupo3), que é composto pelas restantes 10 amostras.

A maior prevalência de resultados satisfatórios corresponde ao Grupo 1 (gráfico 3.2) com 68% das amostras, no Grupo 2 (gráfico 3.3) 60% das amostras são satisfatórias, enquanto o Grupo 3 (gráfico 3.4) possui a menor percentagem de amostras satisfatória com apenas 10% com esse nível de qualidade. Quanto à qualidade aceitável somente o Grupo 1 e o Grupo 3 apresentam valores, com 23% e 30% das amostras, respetivamente.

Por comparação, os alimentos que apresentaram a maior percentagem de amostras não satisfatórias pertencem ao Grupo 3, com 60% das amostras, o Grupo 2 possui 40% das amostras e o Grupo 1 possui a menor percentagem com apenas 9% das amostras.

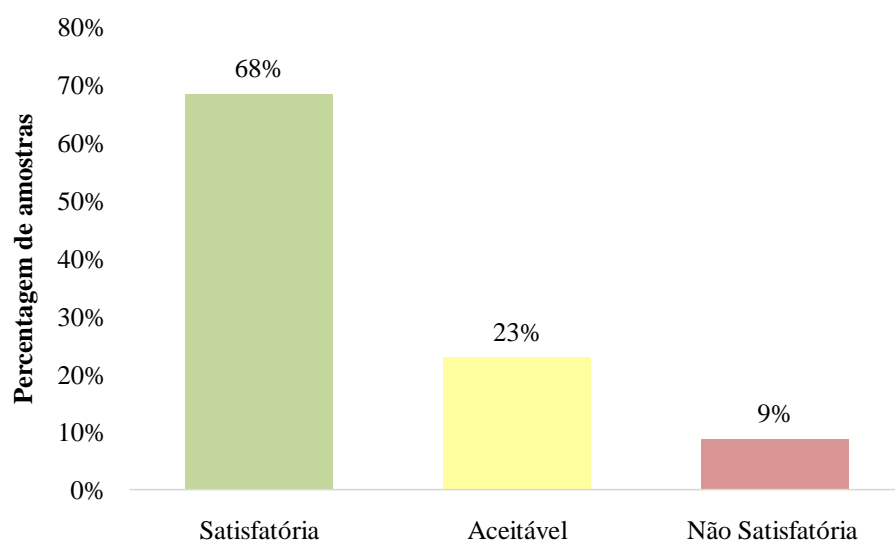


Gráfico 3.2- Qualidade das amostras dos alimentos no Grupo 1 (n=57)

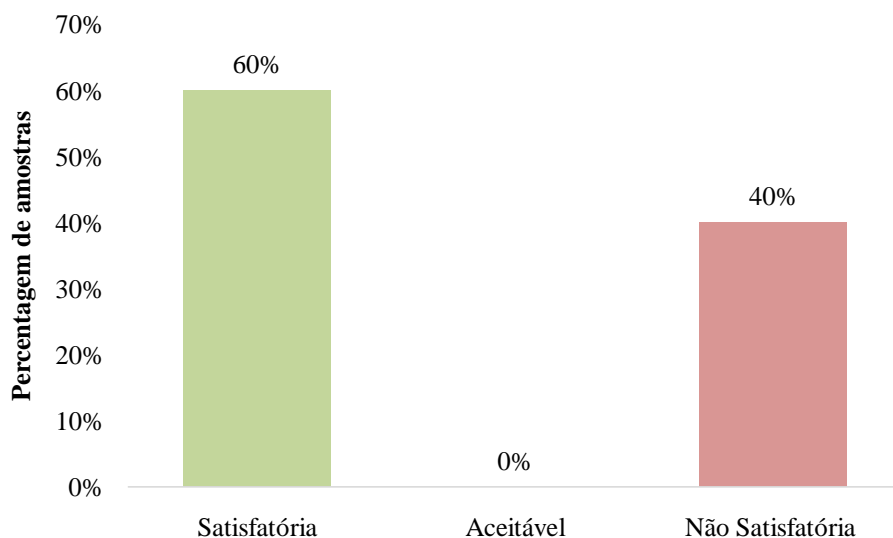


Gráfico 3.3- Qualidade das amostras dos alimentos no Grupo 2 (n=5)

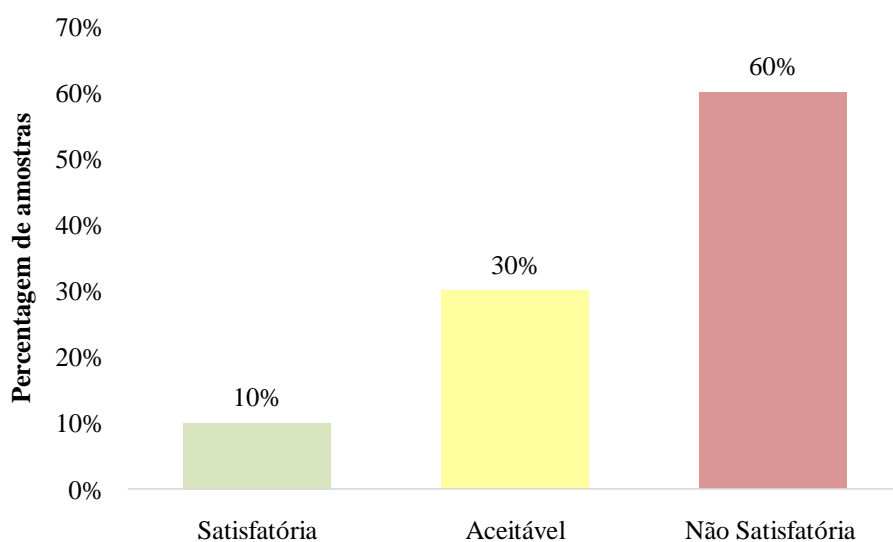


Gráfico 3.4- Qualidade das amostras dos alimentos no Grupo 3 (n=10)

Quanto ao tipo de confeção, esta pode ser dividida entre confeção local ou por serviços de catering. Foram analisadas um total de 72 amostras. Em relação à qualidade geral do tipo de confeção foram testadas, 23 amostras para os serviços de catering e 49 para a confeção local.

No que diz respeito à qualidade geral das amostras (gráfico 3.5), tanto a nível de catering como de confeção local a maioria das amostras são satisfatórias, 69,6% e 55%, respetivamente. Em relação a valores aceitáveis, o catering constitui 8,7% das amostras e a confeção local, 29%. Por fim, no que diz respeito a amostras não satisfatórias, o catering apresenta a maior percentagem de amostras, com 21,7% em relação à confeção local que possui 16% das amostras.

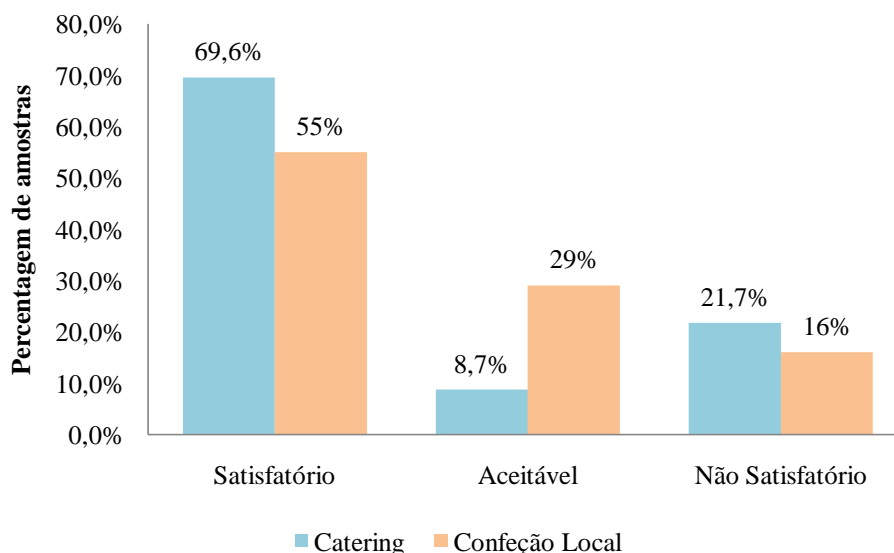


Gráfico 3.5- Qualidade geral das amostras de acordo com o tipo de confeitura (catering n=23; confeitura local n=49)

Na qualidade alimentar de acordo com o grupo de alimentos, a quantidade de amostras relacionadas ao catering no Grupo 1 é de 20 amostras, no Grupo 2, 2 amostras e no Grupo 3, somente 1 amostra. Na confeitura local, 37 das amostras pertencem ao Grupo 1, 3 amostras ao Grupo 2 e o Grupo 3 possui 9 amostras.

No que diz respeito às amostras satisfatórias no gráfico 3.6 (Grupo 1) é possível observar que 75% das amostras do catering são satisfatórias. Em relação à confeitura local, 65% das amostras do Grupo 1 são satisfatórias, relativamente ao Grupo 2 (gráfico 3.7) constatou-se que 50% das amostras se apresentaram satisfatórias e que no Grupo 3 (gráfico 3.8) esta percentagem é menor, apenas 11%.

Quanto às amostras de qualidade aceitável somente no Grupo 1 há amostras de catering com 10%. Na confeitura local, o Grupo 1 têm 30% das amostras e o Grupo 3, 33%.

Na qualidade não satisfatória, em relação ao catering, os três grupos apresentam resultados, no Grupo 1 corresponde a 15% das amostras, no Grupo 2, 50% e no Grupo 3, 100%. Na confeitura local, no Grupo 1 possui a menor percentagem com 5% das amostras, no Grupo 2 com 33% e no Grupo 3, 56% das amostras analisadas não satisfatórias.

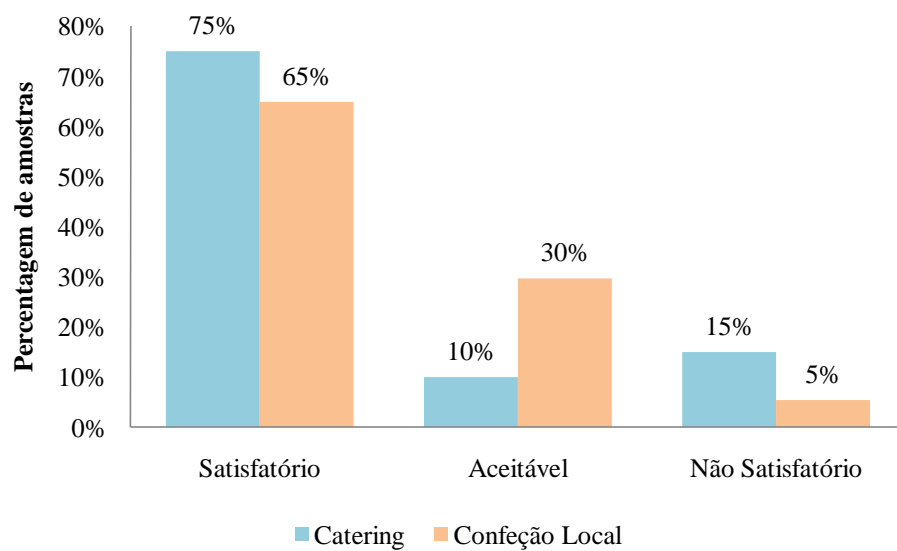


Gráfico 3.6- Qualidade das amostras de acordo com o tipo de confeitura no Grupo 1 (catering n= 20; confeitura local n=37)

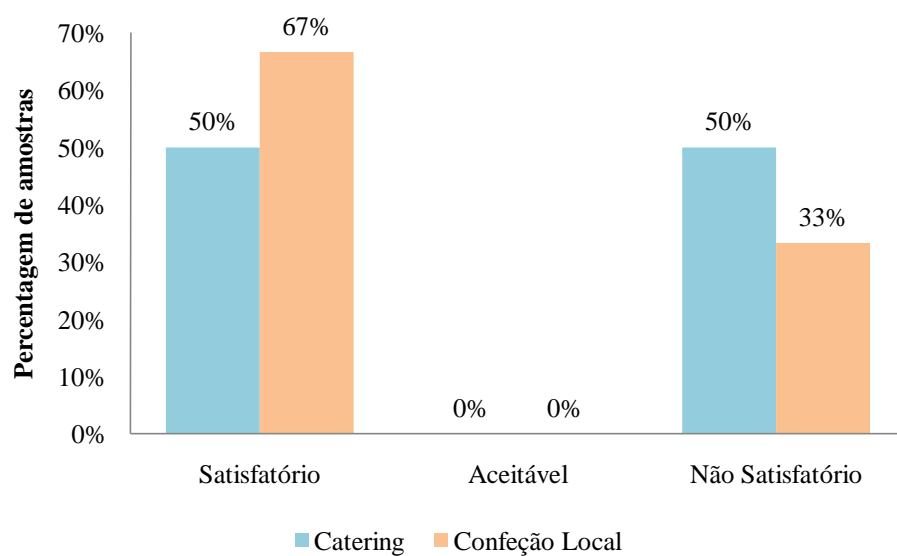


Gráfico 3.7- Qualidade das amostras de acordo com o tipo de confeitura no Grupo 2 (catering n= 2; confeitura local n=3)

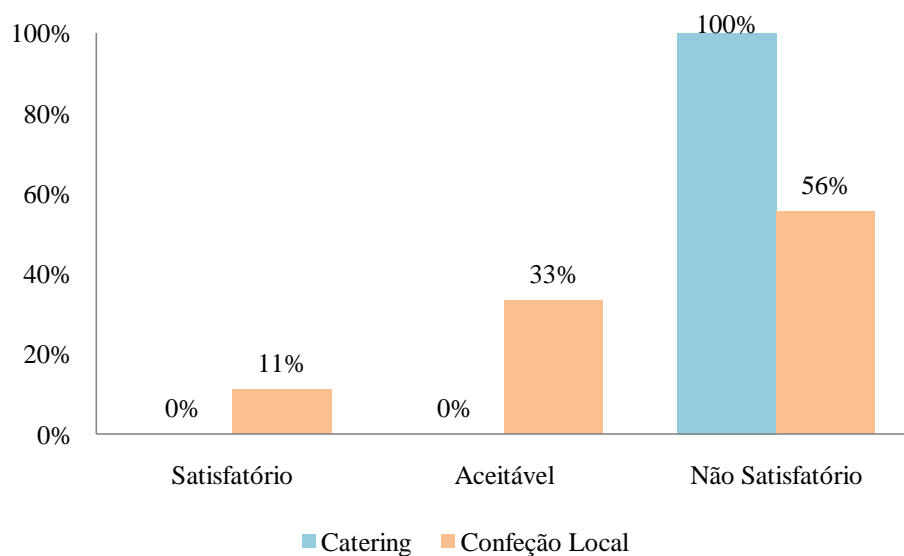


Gráfico 3.8- Qualidade das amostras de acordo com o tipo de confeção no Grupo 3 (catering n= 1; confeção local n=9)

3.1- Enumeração e detecção de microrganismos nos alimentos

Pesquisa de *Salmonella spp.*

Em relação à detecção de *Salmonella spp.* (Gráfico 3.9) de acordo com a Tabela 1.1 a sua interpretação pode ser classificada através da sua presença ou ausência em 25g de amostra. Das 55 amostras analisadas todas elas (100%) apresentaram-se como ausentes de *Salmonella spp.* em 25g, ou seja, satisfatórias. O facto de esta bactéria se apresentar como ausente em todas as amostras analisadas indica que a qualidade microbiológica em relação a este agente patogénico é satisfatória.

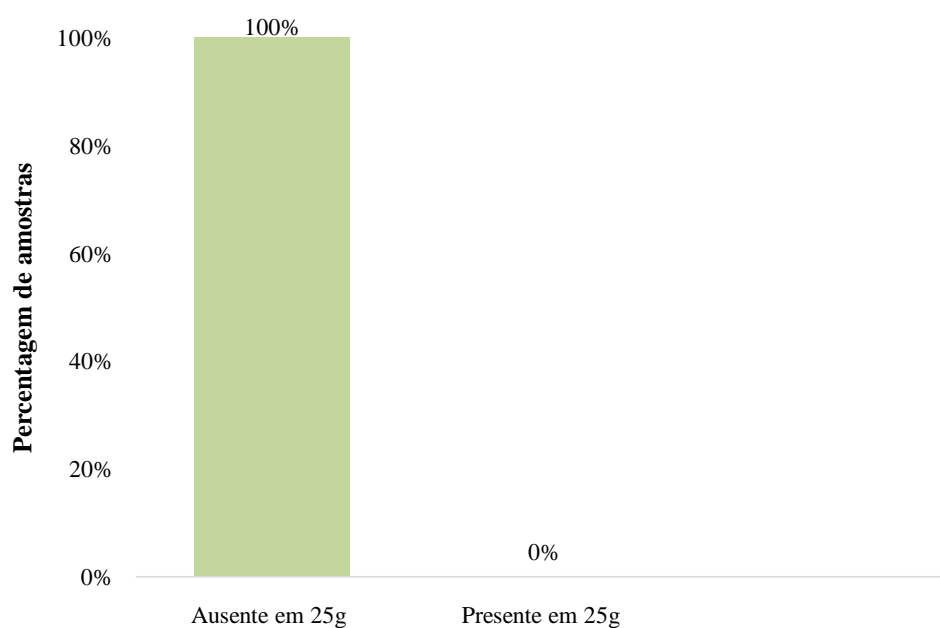


Gráfico 3.9- Pesquisa de *Salmonella spp.* nos alimentos (n=55)

Contagem de *E.coli*

Em relação à contagem de *E.coli*, foram analisadas um total de 69 amostras, para este microrganismo não há distinção dos valores de referência entre o Grupo 1 e o Grupo 2 dos alimentos (Tabela 1.1) logo os seus resultados são apresentados juntos, com 60 amostras. O Grupo 3 é constituído pelas restantes 9 amostras, a maioria dos resultados desta análise foram de qualidade satisfatória. No gráfico 3.10 (Grupo 1 e 2), 98% das amostras são satisfatórias, no entanto houve 1 amostra (pertence ao Grupo 1) em que foi detetada a presença desta bactéria, correspondendo aos 2% que possuem a qualidade não satisfatória. Para o gráfico 3.11 (Grupo 3), todas as 9 amostras foram satisfatórias, ou seja não foi detetada a presença desta bactéria.

As análises de *E.coli* foram divididas de acordo com o seu grupo de alimento, para o Grupo 1 e 2 o valor de qualidade microbiológica satisfatória atribuído é inferior a 1×10^1 UFC/g e para o Grupo 3 para que as amostras sejam consideradas satisfatórias é necessário que o seu valor seja inferior ou igual a 1×10^1 UFC/g.

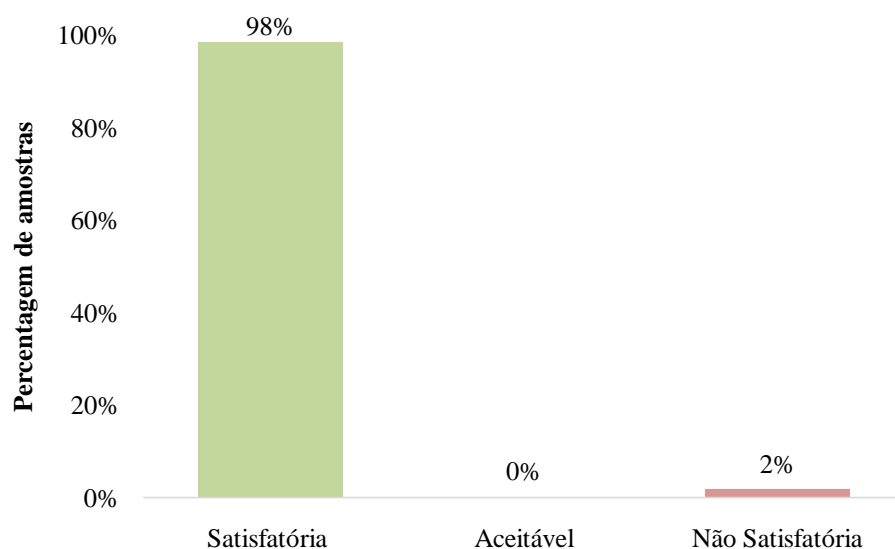


Gráfico 3.10- Contagem de *E.coli* nos alimentos nos Grupos 1 e 2 (n=60)

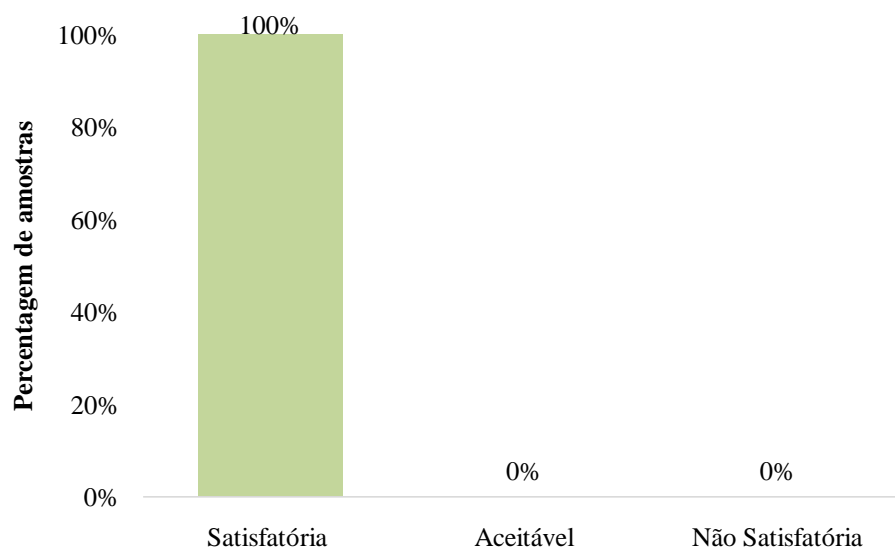


Gráfico 3.11- Contagem de *E.coli* nos alimentos no Grupo 3 (n=9)

Contagem de Estafilococos coagulase positiva

Para a contagem de Estafilococos coagulase positiva foram analisadas as 72 amostras, dessas 97% delas apresentaram resultados satisfatórios e as restantes (3%) tiveram resultados não satisfatórios (Gráfico 3.12). Os valores guia de qualidade microbiológica para estafilococos coagulase positiva são os mesmos para todos os grupos de alimentos sendo os três grupos avaliados com os mesmos critérios, ou seja, para que as amostras analisadas tenham uma qualidade satisfatória é necessário que os valores sejam inferiores a $1,0 \times 10^2$ UFC/g. Uma vez que duas amostras tiveram resultados compreendidos entre superiores ou iguais a $1,0 \times 10^2$ UFC/g e inferiores ou iguais a $1,0 \times 10^4$ UFC/g a sua qualidade microbiológica é não satisfatória.

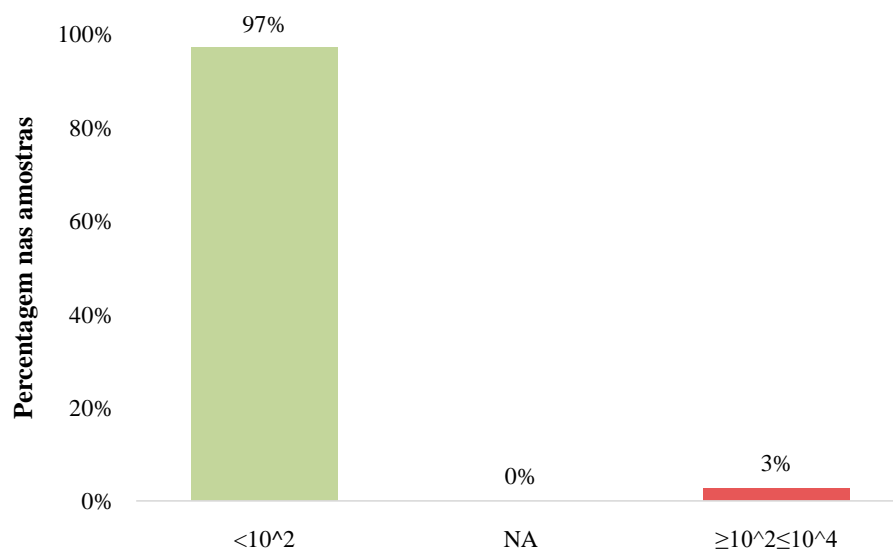


Gráfico 3.12- Contagem de Estafilococos coagulase positiva nos alimentos (n=72)

Contagem de microrganismos totais a 30°C

Das 70 amostras analisadas em relação à contagem de microrganismos totais a 30°C, 57 amostras correspondem aos alimentos que pertencem ao Grupo 1 (gráfico 3.13), 5 amostras pertencem ao Grupo 2 (gráfico 3.14) e as restantes 8 amostras pertencem ao Grupo 3 (gráfico 3.15). Este tipo de método, por ser o menos seletivo, é um dos que apresenta mais resultados uma vez que o meio de cultura não apresenta grande especificidade, logo é suscetível a crescer o maior número de bactérias. De acordo com a Tabela 1.1, para esta análise cada grupo de alimentos tem os seus próprios valores de qualidade.

Relativamente ao Grupo 1, 67% das amostras foram satisfatórias, com uma concentração de microrganismos inferior ou igual a $1,0 \times 10^2$ UFC/g; no Grupo 2, 60% das amostras apresentaram valores iguais ou inferiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g e em relação ao Grupo 3, 12,5% das amostras apresentaram valores inferiores ao limite de qualidade satisfatória $1,0 \times 10^4$ UFC/g.

A nível da qualidade microbiológica aceitável, o Grupo 1 possui a menor percentagem de amostras, 33% para os quais os limites estabelecidos são compreendidos entre superior a $1,0 \times 10^2$ UFC/g e inferior ou igual a $1,0 \times 10^4$ UFC/g. No Grupo 2, 40% das amostras tiveram valores entre superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g e iguais ou inferiores a $1,0 \times 10^5$ UFC/g, o Grupo 3 foi o que teve a maior percentagem de amostras aceitáveis com 62,5% delas com concentrações limite compreendidas entre superiores a $1,0 \times 10^4$ UFC/g e inferiores ou iguais a $1,0 \times 10^6$ UFC/g.

Relativamente à qualidade microbiológica não satisfatória apenas o Grupo 3 que é composto por saladas/ vegetais/ frutas cruas apresentou resultados com concentrações de microrganismos totais a 30°C superiores a $1,0 \times 10^6$ UFC/g (25% das amostras analisadas).

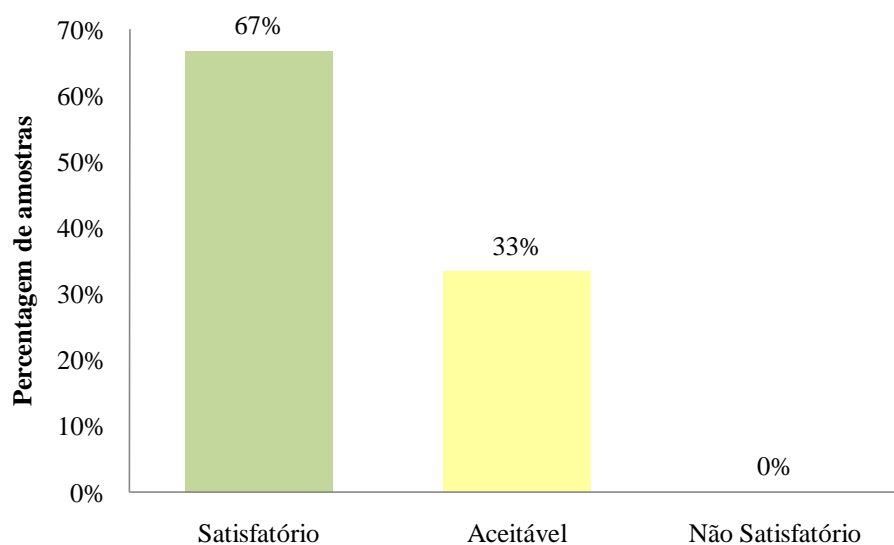


Gráfico 3.13- Contagem de microrganismos totais a 30°C no Grupo 1 (n=57)

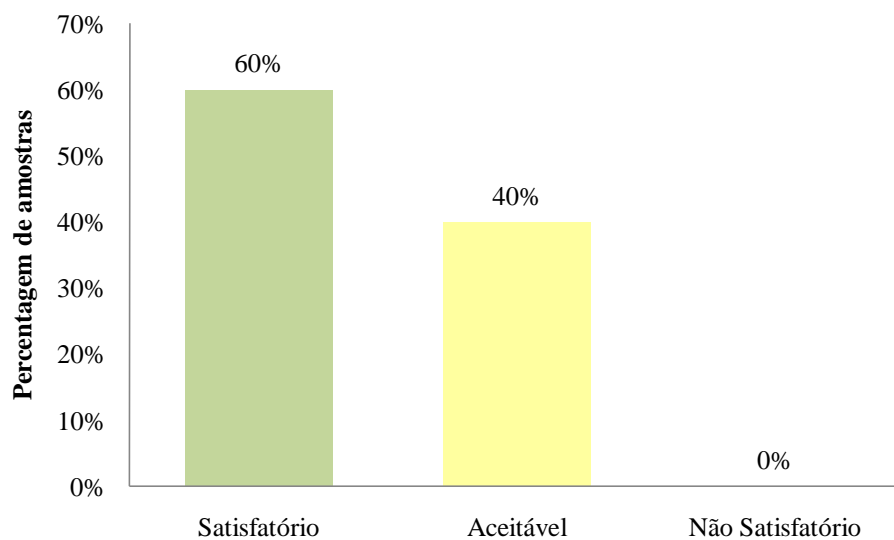


Gráfico 3.14- Contagem de microrganismos totais a 30°C no Grupo 2 (n=5)

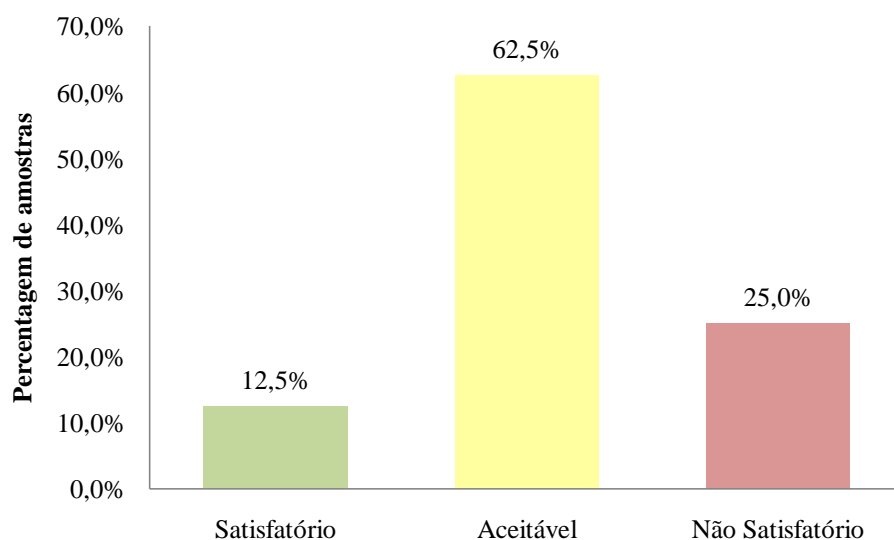


Gráfico 3.15- Contagem de microrganismos totais a 30°C no Grupo 3 (n=8)

Contagem de coliformes a 30°C

Na enumeração de coliformes a 30°C foram analisadas 68 amostras de alimentos, dessas 54 pertencem ao Grupo 1 (gráfico 3.16), 5 amostras correspondem ao Grupo 2 (gráfico 3.17) e as restantes 9 ao Grupo 3 (gráfico 3.18). Assim como nos microrganismos a 30°C, cada grupo teve os seus valores limite de qualidade microbiológica.

Em relação às amostras satisfatórias, o Grupo 1 com 85% das amostras e o Grupo 2 com 60%, têm o mesmo valor limite de concentração inferior ou igual a $1,0 \times 10$ UFC/g e para o Grupo 3, 22,2% das amostras tiveram uma concentração de coliformes, igual ou inferior a $1,0 \times 10^2$ UFC/g. Quanto aos limites aceitáveis, no Grupo 1 somente 9% das amostras atingiram resultados compreendidos entre superiores a $1,0 \times 10$ UFC/g e inferiores ou iguais a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, para o Grupo 3 correspondeu a 11,1% das amostras com valores limites considerados entre superiores a $1,0 \times 10^2$ UFC/g e iguais ou inferiores a $1,0 \times 10^4$ UFC/g.

Por fim, nas amostras não satisfatórias, dos três grupos, o Grupo 1 foi o que apresentou a menor percentagem com 6% das amostras com resultados superiores a $1,0 \times 10^2$ UFC/g, para o Grupo 2, 40% das amostras tiveram valores superiores a $1,0 \times 10^3$ UFC/g, por fim o Grupo 3 possui a maior percentagem de resultados em relação à qualidade não satisfatória, 66,7% das amostras com concentração superior a $1,0 \times 10^4$ UFC/g.

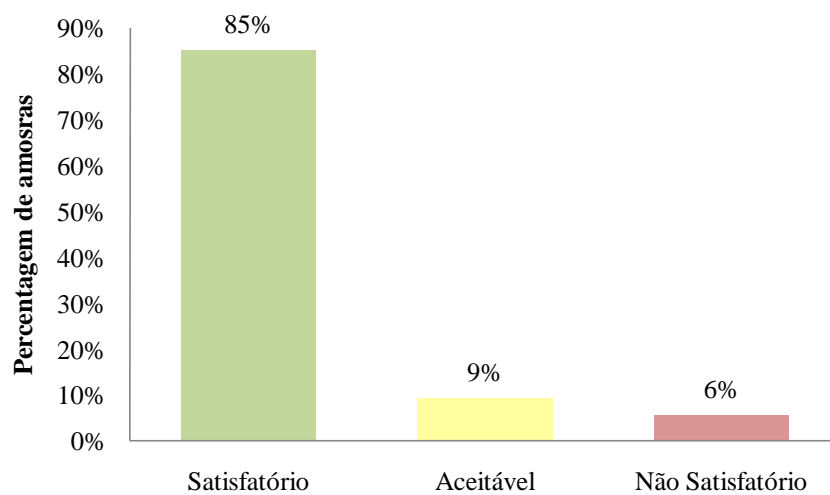


Gráfico 3.16- Contagem de coliformes a 30°C no Grupo 1 (n=54)

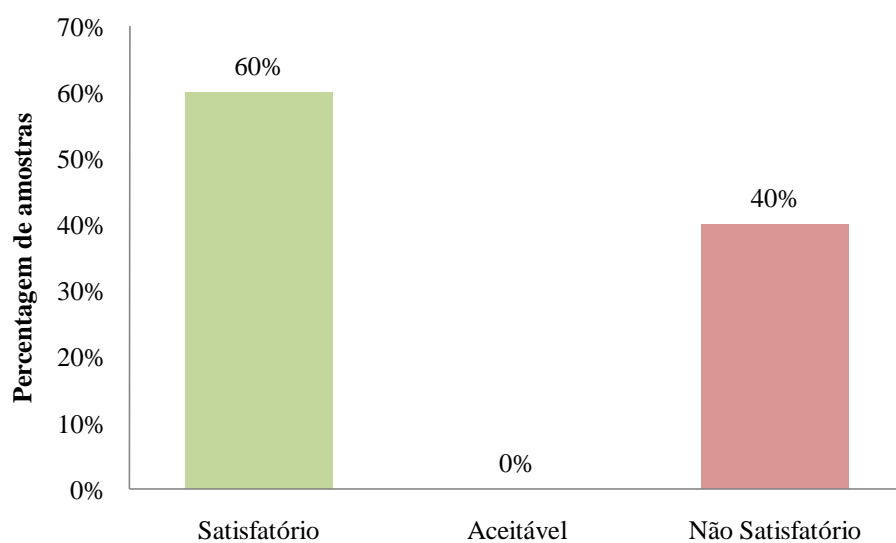


Gráfico 3.17- Contagem de coliformes a 30°C no Grupo 2 (n=5)

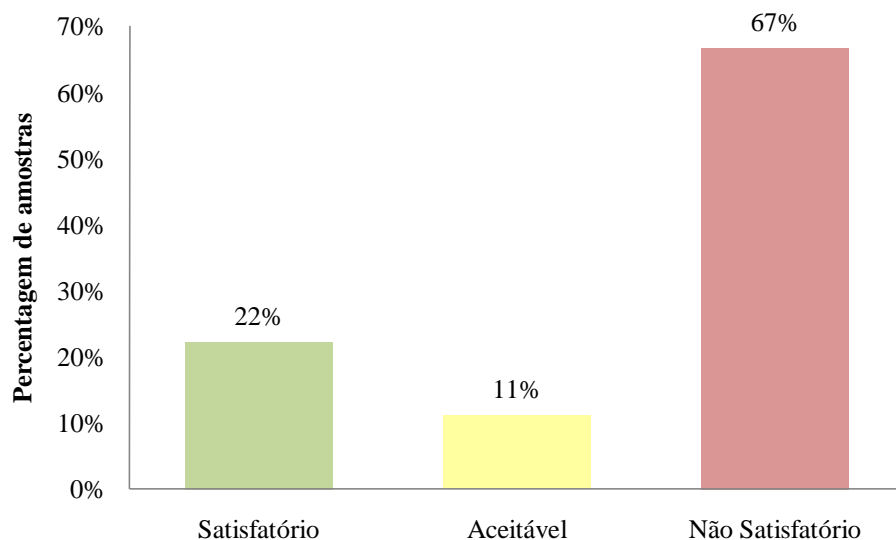


Gráfico 3.18-Contagem de coliformes a 30°C no Grupo 3 (n=9)

Contagem de *Listeria monocytogenes*

Para a deteção e enumeração de *Listeria monocytogenes* foram analisadas 62 amostras não havendo distinção entre os grupos alimentares relativamente aos limites de concentração de microrganismos. Relativamente às amostras analisadas, todas elas (100%) apresentaram resultados de qualidade microbiológica satisfatória, ou seja, concentração inferior a $1,0 \times 10^2$ UFC/g (Gráfico 3.19).

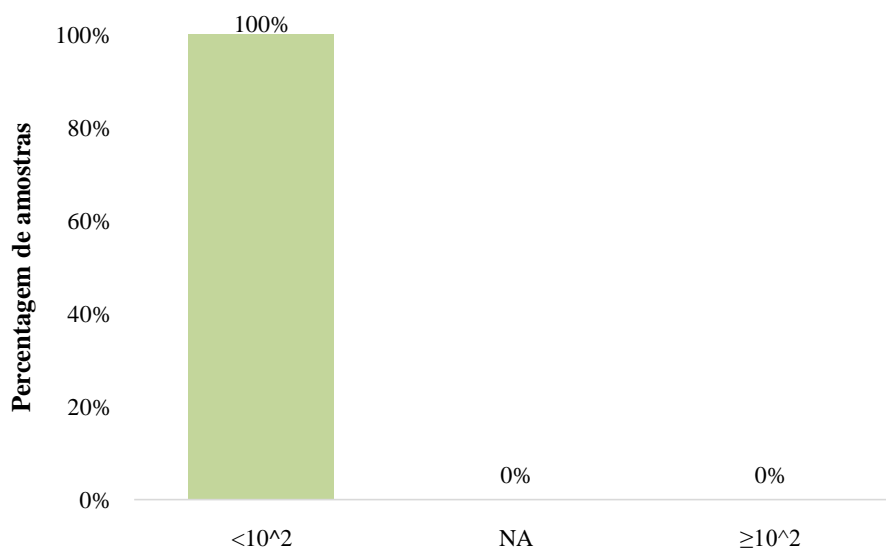


Gráfico 3.19- Contagem de *Listeria monocytogenes* nos alimentos (n=62)

3.2- Controlo higio-sanitário de superfícies

Tanto para as zaragatoas de superfícies como para as das mãos dos manipuladores a Legislação Nacional não estabelece valores limites de aceitação, logo, para este estudo, os valores foram estabelecidos por técnicos da Direção Municipal de Educação e Desporto da Câmara de Lisboa.

Assim, tal como nos alimentos, os limites estabelecidos para as concentrações de microrganismos em ambos os tipos de zaragatoas variam de acordo com o parâmetro analisado.

De acordo com a Tabela 3.1, e no que diz respeito à contagem de coliformes a 30°C, das 105 amostras analisadas, 90% apresentaram uma concentração de bactérias inferior a 1 UFC/cm² e 10% apresentaram valores superiores a 1 UFC/cm². Quanto à contagem de *E.coli* foram analisadas 107 amostras, tendo cerca de 98% delas valores inferiores a 1UFC/cm². No entanto, 2% apresentaram resultados superiores a 1 UFC/cm². Relativamente à contagem de totais viáveis (CTV) a 30°C, das 98 amostras analisadas, 84% apresentaram uma concentração inferior a 10 UFC/cm², sendo que os restantes 16% a concentração de microrganismos determinada foi superior a 10 UFC/cm².

Para a contagem de totais viáveis a 37°C apenas uma amostra foi analisada e apresentou uma concentração também inferior a 10 UFC/cm². No que diz respeito aos estafilococos coagulase positiva, estes é um dos parâmetros menos analisados nas superfícies por isso foram analisadas somente 22 amostras, todas elas com uma concentração inferior a 1UFC/cm².

Tabela 3.1- Resultados em percentagem das amostras das zaragatoas de superfície de acordo com os respetivos parâmetros

	Coliformes	<i>E.coli</i>	Contagem de totais viáveis (CTV) a 30°C	CTV a 37°C	Contagem de estafilococos coag. (+)
Inferior a 1 UFC/cm ²	90% (n=95)	98% (n=105)	-	-	100% (n=22)
Superior a 1 UFC/cm ²	10% (n=10)	2% (n=2)	-	-	0%
Inferior a 10 UFC/cm ²	-	-	84% (n=59)	100% (n=1)	-
Superior a 10 UFC/cm ²	-	-	16% (n=39)	0%	-

3.3- Controlo higio-sanitário das mãos dos manipuladores

Como referido acima, a Legislação Nacional não estabelece valores limite de aceitação para as zaragatoas das mãos dos manipuladores, logo, os valores foram estabelecidos por técnicos da Direção Municipal de Educação e Desporto da Câmara de Lisboa.

A Tabela 3.2 apresenta os resultados obtidos ao longo deste estudo em relação às zaragatoas das mãos dos manipuladores de alimentos com um total de 132 amostras.

No que diz respeito à contagem de coliformes a 30°C, das 126 amostras, 97% delas tiveram uma concentração inferior a 1UFC/cm², nas restantes 3% a sua concentração foi superior a 1UFC/cm². Na contagem de *E.coli*, todas as 126 amostras apresentaram concentrações inferiores a 1 UFC/cm². Quanto à contagem de totais viáveis a 30°C, foram analisadas 59 amostras, das quais 83% tiveram resultados inferiores a 10 UFC/cm² e 17% resultados superiores a 10UFC/cm². No caso da contagem

de totais viáveis a 37°C, somente três amostras foram analisadas, todas elas com uma concentração de microrganismos superior a 10 UFC/cm².

Os estafilococos coagulase positiva são um dos parâmetros mais relevantes em relação às zaragoas das mãos dos manipuladores, das 104 amostras analisadas 95% tiveram uma concentração inferior a 1 UFC/cm², os restantes 5% apresentaram valores superiores a 1UFC/cm².

Tabela 3.2- Resultados em percentagem das amostras das zaragoas de mãos dos manipuladores de acordo com os respetivos parâmetros

	Coliformes	<i>E.coli</i>	Contagem de totais viáveis (CTV) a 30°C	CTV a 37°C	Contagem de estafilococos coag. (+)
Inferior a 1 UFC/cm²	97% (n=122)	100% (n=126)	-	-	95% (n=99)
Superior a 1 UFC/cm²	3% (n=4)	0%	-	-	5% (n=5)
Inferior a 10 UFC/cm²	-	-	83% (n=23)	0%	-
Superior a 10 UFC/cm²	-	-	17% (n=36)	100% (n=3)	-

4- Discussão

Em relação à qualidade dos alimentos, é possível observar que a maioria dos resultados cerca de 82% das amostras, são satisfatórios ou aceitáveis, e constituem resultados representativos de boas práticas de higiene e qualidade alimentar. No entanto a quantidade de amostras não satisfatórias (18%) pode ser considerada significativa, pois este valor indicia que é necessário um maior cuidado por parte dos manipuladores em relação à preparação e armazenamento dos alimentos. Ainda assim não foi detetada a presença de microrganismos patogénicos como *Salmonella* e *L. monocytogenes*, e mesmo a nível dos microrganismos indicadores na sua maioria os valores limites foram cumpridos, como será discutido mais à frente. Sendo ainda necessário ressaltar, que a qualidade geral das amostras vai depender do conjunto dos parâmetros analisados, e que não depende somente da análise de um parâmetro.

Relativamente à questão dos alimentos totalmente cozinhados/ alimentos cozinhados com adição de ingredientes crus/ alimentos totalmente crus, como referido no capítulo dos resultados, um dos objetivos era verificar a existência de discrepância entre os grupos dos alimentos. O Grupo 1 inclui somente os alimentos cozinhados com 68% das amostras satisfatórias, o que aponta que quando os alimentos passam por algum tipo de tratamento térmico poderá haver uma diminuição significativa da presença de microrganismos. No entanto 9% das amostras apresentaram concentrações de microrganismos que atingiram valores não satisfatórios o que aponta que poderá ter ocorrido algum tipo de contaminação cruzada após o tratamento térmico, como indica Bryan (1978), que ressalta que para os alimentos que passaram por um tratamento térmico se tornarem veículos de doenças transmitidas por alimentos é necessário que as bactérias tenham sobrevivido ao processamento ou que a comida tenha sido contaminado após o processamento a quente. O Grupo 2 é composto por alimentos cozinhados com adição de ingredientes crus e constitui o grupo com a menor quantidade de

amostras, 5 amostras com 60% dos resultados satisfatórios e 40%, não satisfatórios, provavelmente causado pela adição dos ingredientes crus.

Outro ponto que se observa é que o Grupo 3, que é composto por alimentos crus como vegetais e frutas, possui a maior percentagem de amostras não satisfatórias (60%), o que era esperado uma vez que estes alimentos não são sujeitos a nenhum processo térmico, somente à lavagem com produtos específicos (exemplo: Sonaril DSF) por parte dos manipuladores. De facto, segundo Jay (2005) é possível esperar que a incidência de microrganismos em vegetais reflita a qualidade sanitária das etapas de processamento e a condição microbiológica do produto cru no momento do processamento. Mas ainda de acordo com Doyle & Buchanan (2007) é ressaltada a importância da limpeza das frutas e vegetais com produtos clorados de modo a diminuir o número de contaminantes microbianos na superfície dos alimentos crus.

Na relação entre a qualidade dos serviços de catering e a confeção local, o Grupo 1 apresenta a maior percentagem de amostras não satisfatórias, provenientes dos serviços de catering, mas ainda assim possui também a maior percentagem de amostras satisfatórias. Quanto à confeção local é também o grupo com a menor percentagem de amostras não satisfatórias (5%). No Grupo 2, as amostras de catering possuem a mesma percentagem de amostras satisfatórias e não satisfatórias, e para a confeção local há uma maior percentagem de amostras satisfatórias que não satisfatórias. O grupo 3, dos alimentos crus, apresenta somente uma amostra não satisfatória para o catering, logo a sua percentagem, não é representativa pois foi a única amostra de catering pertencente ao Grupo 3 servida neste período. Contudo, em relação à confeção local foi o grupo com a maior percentagem de amostras não satisfatórias (56%), ressaltando novamente quão importante é a lavagem correta de vegetais e frutas crus.

Uma análise realizada por Petruzzelli et al. (2018) refere que diversos estudos concluíram que serviços de catering podem ser a fonte de diversos surtos alimentares como salmolenose e listeriose. Mas uma vez que os serviços de catering tem um maior rigor ao longo de todo o processo, desde a produção, armazenamento e transporte dos alimentos (Gertal, n.d.) é expectável que estes apresentem melhores resultados que a confeção local, contrariando os resultados do estudo referido anteriormente.

Em relação aos parâmetros avaliados, *Salmonella* é um dos microrganismos patogénicos deste estudo e como tal é extremamente importante que os seus valores estejam dentro dos valores guia de qualidade satisfatória o que foi possível observar pois 100% das amostras tiveram como resultado, ausente em 25g. Como descrito por Cornelissen, Fisher & Harvey (2013) as infeções causadas por *Salmonella* podem causar infeções graves como gastroenterite, febre tifoide e bacteremia, por essa razão é importante que os valores desta bactéria se mantenham satisfatórios pois estas refeições são consumidas por crianças que englobam a categoria de grupos de risco.

Sendo *E.coli* um dos microrganismos indicadores para determinar se ocorreu contaminação de origem fecal, é relevante que as amostras dos alimentos se encontrem dentro dos valores de qualidade satisfatória. Na maioria dos resultados, os valores foram satisfatórios, no entanto houve uma amostra do Grupo 1 na qual foi detetada a presença desta bactéria. O que pode ser alarmante pois segundo Doyle & Buchanan (2007), a contaminação de um alimento com *E.coli* implica o risco de que outros patogénicos entéricos possam estar presentes nos alimentos, além de que esta bactéria tem como habitat o trato intestinal dos seres humanos (Ray, B., 2004).

Quanto aos Estafilococos coagulase positiva, 97% das amostras foram satisfatórias, porém 2 amostras (3%) tiveram concentrações deste microrganismo que ultrapassaram os limites do satisfatório. Ressaltado por Doyle & Buchanan (2007) os humanos podem ser portadores de estafilococos e fontes de disseminação para outros assim como para os alimentos. Ainda acrescentam que a disseminação dos estafilococos pode ocorrer durante a preparação dos alimentos, logo é possível atribuir que a possível causa dessas duas amostras não satisfatórias seja resultado de contaminação por parte dos manipuladores.

Os microrganismos totais a 30°C são dos indicadores de qualidade dos alimentos mais genéricos e abrangentes, indicando a adequação da temperatura e o controlo do saneamento do processamento, transporte e armazenamento (Herrera A.G., 2001). Por essa razão este parâmetro foi um dos que teve a maior variedade de resultados. Somente o Grupo 3 possui amostras não satisfatórias, 25% o que comprova novamente que o grupo dos alimentos crus é o mais suscetível a possíveis contaminações.

A contagem de coliformes a 30°C foi outro dos parâmetros com a maior variedade de resultados entre os alimentos, novamente os alimentos do Grupo 1 possuem a maior porção de amostras satisfatórias, ressaltando que quando os alimentos passam por um tratamento térmico a presença de microrganismos diminui significativamente, em relação às amostras não satisfatórias, Doyle & Buchanan (2007) indicam que a fonte de coliformes nesses tipos de produtos após o processamento térmico é geralmente causado pelo ambiente de processamento, higienização inadequada e /ou controlo de temperatura. O Grupo 2 teve uma maior percentagem de amostras satisfatórias do que não satisfatórias, as amostras não satisfatórias podem ser resultado dos comportamentos acima descritos ou pela adição de alimentos crus aos já cozinhados resultando numa possível contaminação.

Por fim no Grupo 3, composto por alimentos crus como podia ser esperado a maioria das amostras são não satisfatórias, o que demonstra que a limpeza e/ou armazenamento das frutas e vegetais não são adequados.

Juntamente com *Salmonella*, *L.monocytogenes* é um dos microrganismos patogénicos abordados neste estudo e como tal é relevante que os seus valores se mantenham satisfatórios. Todas as amostras analisadas tiveram resultados satisfatórios, ou seja, a sua concentração foi inferior a $1,0 \times 10^2$ UFC/g. Segundo Hamidiyan et al. (2018) por esta bactéria ter alta incidência em diferentes grupos de alimentos e um alta taxa de mortalidade por listeriose, *L.monocytogenes* tem sido considerada um risco à saúde pública principalmente para os grupos de risco. Para além disso a presença de qualquer *Listeria spp.* em alimentos pode ser um indicador de más condições de higiene.

Por estas razões, o facto de todas as amostras terem resultados satisfatórios indica que houve boas práticas de segurança alimentar, novamente tendo em conta que as refeições são servidas a crianças.

Em relação às condições de manuseamento tanto para os esfregaços de superfícies como das mãos dos manipuladores os resultados na sua maioria encontraram-se abaixo dos valores estabelecidos como limite. No entanto, é de referir que, no que diz respeito às zaragatoas das superfícies, foi a única análise em todo o estudo a acusar a presença de *E.coli* com duas amostras com resultados acima de 1 UFC/cm². Nos coliformes 10% das amostras apresentaram resultados superiores a 1 UFC/cm². Os microrganismos totais a 30°C tiveram 16% das amostras com valores superiores a 10 UFC/cm². Tanto os microrganismos totais a 37°C como os estafilococos coagulase positiva tiveram todas as amostras inferiores aos valores limites. Como referido acima os microrganismos totais são os indicadores de qualidade dos alimentos mais genérico, porém *E.coli* e os coliformes são indicadores extremamente importantes logo a sua presença indica que houve falhas de higiene no manuseio dos materiais. Como refere Falcó et al. (2018) as superfícies contaminadas são relevantes na disseminação de bactérias pois sabe-se que o material que entra em contacto em todos os processos de preparação de alimentos como facas ou tábuas de cortar podem ser reservatórios de microrganismos. Ainda de acordo com Oh et al. (2016), embora existam diversos procedimentos para a desinfeção das superfícies de contato com os alimentos e a redução de outros contaminantes bacterianos, essa desinfeção pode ser anulada devido a possíveis manuseios incorretos após a limpeza e desinfeção.

Os manipuladores de alimentos possuem um papel importante na prevenção de intoxicações alimentares durante a produção e distribuição de alimentos. Estes podem contaminar os alimentos crus

e processados, podendo também ser portadores assintomáticos de microrganismos que contaminam os alimentos (Walker et al., 2003), ou ainda contaminarem os alimentos devido à falta de higiene pessoal ou à contaminação cruzada (Ayçiçek et al., 2004). Neste estudo a maioria dos parâmetros avaliados nas mãos dos manipuladores foram abaixo dos valores estipulados. Bactérias como *E.coli* e microrganismos totais a 37°C tiveram todos os seus resultados inferiores ao valor limite. Relativamente aos estafilococos coagulase positiva, 5% das amostras tiveram concentrações superiores a 1 UFC/cm² o que apesar de ser um valor baixo indica que é necessário lembrar aos manipuladores os devidos cuidados de higiene, uma vez que o habitat natural desta bactéria é a pele e as mucosas de humanos (Baptista et al., 2016). A quantidade de amostras com coliformes acima dos limites também foi baixa, 3% das amostras, o que é possível considerar um valor bom, pois indica que não houve grande contaminação. Nos microrganismos totais a 30°C houve 17% das amostras com concentrações superiores a 10 UFC/cm² o que uma vez que este parâmetro é considerado um dos indicadores de contaminação pode ser considerado um valor ainda assim significativo.

5-Conclusão

Neste estudo após a análise e discussão dos resultados é possível concluir que no que diz respeito à qualidade microbiológica e condições de manuseamento dos alimentos de forma geral os resultados foram satisfatórios, como expectável.

Uma das conclusões que é possível obter deste estudo é que apesar de haver amostras com resultados de qualidade microbiológica não satisfatória, estes são menos do que os de qualidade satisfatória, mas ainda assim é necessário que haja uma maior responsabilidade por parte dos manipuladores para que a quantidade de amostras não satisfatórias seja menor. O facto de a maioria dos resultados serem satisfatórios, é relevante, pois são um indicador de que estão a ser colocadas em prática as diretrizes de higiene e segurança alimentar, principalmente tendo em conta que estas refeições são fornecidas a Escolas Básicas de 1º Ciclo, logo são consumidas por crianças que são notoriamente conhecidas como um grupo de risco.

Outras das conclusões observadas é que, é esperado que os serviços de catering apresentem a maior percentagem de amostras satisfatórias em relação à confeção local, o que foi possível verificar; pois estes serviços possuem um maior rigor em todas as fases do processo de produção de uma refeição, enquanto na confeção local poderá haver negligências por parte dos manipuladores, em relação à preparação e armazenamento dos alimentos.

Também foi possível concluir que como esperado os alimentos crus apresentaram a maior percentagem de amostras não satisfatórias, indicando que poderá haver descuido por parte dos manipuladores em relação à lavagem de vegetais e frutas levando à ocorrência de contaminações.

É importante salientar que os alimentos não apresentaram qualquer tipo de contaminação por microrganismos patogénicos como *Salmonella spp.* e *L.monocytogenes*, o que é extremamente relevante pois, estas bactérias são responsáveis por causar doenças graves como salmolenose e listeriose, que podem ser potencialmente fatais para os grupos de risco. A nível de microrganismos indicadores de contaminação nos alimentos, os microrganismos totais a 30°C e os coliformes foram detetadas algumas amostras não satisfatórias, mas na sua maioria foram satisfatórias ou aceitáveis. Quanto à *E.coli*, a sua presença foi detetada em 1 amostra, o que pode ser preocupante pois esta bactéria é encontrada no trato intestinal dos seres humanos. No entanto, não tivemos conhecimento de qualquer surto de doença no período deste estudo.

Por fim na análise dos estafilococos coagulase positiva houve 2 amostras que tiveram qualidade não satisfatória, o que pode ser problemático, mas como referido acima não houve registos de intoxicações.

Em relação às zaragatoas de superfícies e das mãos dos manipuladores, na sua maioria os valores estavam abaixo dos valores estipulados, o que indica que tanto as superfícies como as mãos dos manipuladores estavam bem higienizadas. Porém, houve duas amostras das superfícies em que se detetou a presença de *E.coli*. Apesar de haver uma amostra nos alimentos no qual foi detetada a presença desta bactéria, as amostras são provenientes de escolas diferentes, logo não há relação entre as duas contaminações.

Por fim, em modo de sugestão, para futuras análises seria interessante se houvesse uma monitorização anual das Escolas Básicas geridas pela Câmara Municipal de Lisboa, ou seja, realizar análises anuais de modo a se poder avaliar com maior informação se as medidas de segurança implementadas apresentam resultados satisfatórios em relação à qualidade microbiológica ao longo dos anos, sendo também mais fácil detetar algum tipo de alteração na qualidade das amostras. Poderia ainda ser interessante acrescentar mais alguns parâmetros para analisar como *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Shigella* e *Campylobacter*, que são bactérias que também normalmente se encontram associadas a surtos alimentares.

6-Referências Bibliográficas

- Ayçiçek, H., Aydoğan, H., Küçükkaraaslan, A., Baysallar, M., & Başustaoglu, A. C. (2004). Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers. *Food Control*, 15 (4), 253-259.
- Baptista, I., Rocha, S. M., Cunha, Â., Saraiva, J. A., & Almeida, A. (2016). Inactivation of *Staphylococcus aureus* by high pressure processing: An overview. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 36, 128-149.
- Bell, C. & Kyriakides, A. (2001). *Salmonella - A Practical Approach to the Organism and its Control in Foods*. Practical Food Microbiology Series. London: Blackie Academic & Professional
- Blood, R. M., & Curtis, G. (1995). Media for 'total' Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 26 (1), 93-115.
- Bryan, F. L. (1978). Factors that Contribute to Outbreaks of Foodborne Disease. *Journal of Food Protection*, 41(10), 816-827.
- Câmara Municipal de Lisboa. (n.d.). Refeições. Acedido a 05 de julho, 2018, <http://www.cm-lisboa.pt/viver/educacao/dentro-da-escola/apoios-escolares-refeicoes/refeicoes>
- Center for Food Safety, Food and Environmental Hygiene Department. (2014). Microbiological Guidelines for Food. Acedido a 30 de agosto, 2018, em http://www.cfs.gov.hk/english/food_leg/files/food_leg_Microbiological_Guidelines_for_Food_e.pdf
- Centers for Disease Control and Prevention. (2006). Multistate Outbreak of *E.coli* O157:H7 Infections Linked to Fresh Spinach (FINAL UPDATE). Acedido a 12 de novembro, 2018, em <https://www.cdc.gov/ecoli/2006/spinach-10-2006.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2009). Multistate Outbreak of *Salmonella* Typhimurium Infections Linked to Peanut Butter, 2008-2009 (FINAL UPDATE). Acedido a 12 de novembro, 2018, em <https://www.cdc.gov/salmonella/2009/peanut-butter-2008-2009.html>
- Centers for Disease Control and Prevention. (2018). Outbreak of *E.coli* Infections Linked to Ground Beef. Acedido a 25 de Outubro, 2018, em <https://www.cdc.gov/ecoli/2018/o26-09-18/index.html>
- Colclasure, V. J., Soderquist, T. J., Lynch, T., Schubert, N., McCormick, D. S., Urrutia, E., . . . Kavouras, J. H. (2015). Coliform bacteria, fabrics, and the environment. *American Journal of Infection Control*, 43(2), 154-158.
- Cornelissen, C. N., Fisher, B. D., & Harvey, R. A. (2013). *Microbiology* (3rd Ed.). Lippincott Williams & Wilkins
- Cowan, M. K. (2012) *Microbiology A Systems Approach*. 3th ed. New York: McGraw-Hill. 180-682
- Doyle, M. P., & Buchanan, R. L. (2007). *Food microbiology: Fundamentals and Frontiers* (3rd ed.). Washington: ASM.

European Food Safety Authority. (2016). Multi-country *Salmonella* outbreak. Acedido a 12 de novembro, 2018, em <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/161027-0>

European Food Safety Authority. (2018). *Listeria monocytogenes*: Update on food borne outbreak. Acedido a 12 de novembro, 2018, em <http://www.efsa.europa.eu/en/press/news/180703>

Falcó, I., Verdeguer, M., Aznar, R., Sánchez, G., & Randazzo, W. (2018). Sanitizing food contact surfaces by the use of essential oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.

Fung, D. Y. (2009). Viable Cell Counts. Acedido a 22 de agosto, 2018, em https://www.biosci-intl.com/news/viable_cell_counts.htm

Gertal. (n.d.) Qualidade e Segurança. Acedido a 18 de março, 2019, em <http://www.gertal.pt/qualidade-seguranca>

Halkman, H., & Halkman, A. (2014). Indicator Organisms. *Encyclopedia of Food Microbiology*, 358-363.

Hamidiyan, N., Salehi-Abargouei, A., Rezaei, Z., Dehghani-Tafti, R., & Akrami-Mohajeri, F. (2018). The prevalence of *Listeria* spp. food contamination in Iran: A systematic review and meta-analysis. *Food Research International*, 107, 437-450.

Herrera A.G. (2001) Mesophilic Aerobic Microorganisms. In: Spencer J.F.T., de Ragout Spencer A.L. (eds) *Food Microbiology Protocols. Methods in Biotechnology*, vol 14. Humana Press

Hoelzer, K., Switt, A. I., Wiedmann, M., & Boor, K. J. (2018). Emerging needs and opportunities in foodborne disease detection and prevention: From tools to people. *Food Microbiology*, 75, 65-71.

Hogg, S. (2005). *Essential Microbiology* (1st ed.). West Sussex: Wiley.

Húngaro, H., Peña, W., Silva, N., Carvalho, R., Alvarenga, V., & Sant'Ana, A. (2014). Food Microbiology. *Encyclopedia of Agriculture and Food Systems*, 213-231

Internacional Standard Organization. (2004). Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*- Part 2: Enumeration method AMENDMENT 1: Modification of the enumeration medium (ISO 11290-2:1998/Amd 1: 2004) Acedido a 21 de novembro, 2018, em <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:11290-2:ed-1:v1:amd:1:v1:en>

Internacional Standard Organization. (2004). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact (ISO 18593:2004) Acedido a 14 de novembro, 2018, em <https://www.iso.org/standard/39849.html>

Internacional Standard Organization. (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of microorganisms- Colony-count technique at 30 °C (ISO 4833:2003) Acedido a 03 de outubro, 2018, em <https://www.iso.org/standard/34524.html>

Internacional Standard Organization. (2002). Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of Salmonella spp. (ISO 6579:2002) Acedido a 05 de outubro, 2018, em <https://www.iso.org/standard/29315.html>

Internacional Standard Organization. (2007). Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations (ISO 7218:2007) Acedido a 10 de outubro, 2018, em <https://www.iso.org/standard/36534.html>

Jay, J. M. (2005). *Modern Food Microbiology* (7th ed.). New York: Springer.

Jordan, K., & McAuliffe, O. (2018). *Listeria monocytogenes* in Foods. *Biological Emerging Risks in Foods Advances in Food and Nutrition Research*, 181-213.

Keeratipibul, S., Techaruwichit, P., & Chaturongkasumrit, Y. (2009). Contamination sources of coliforms in two different types of frozen ready-to-eat shrimps. *Food Control*, 20(3), 289-293.

Mateus, T., Maia, R. L., & Teixeira, P. (2014). Awareness of listeriosis among Portuguese pregnant women. *Food Control*, 46, 513-519.

NP 1828 (1982). Colheita de amostras para análise microbiológica. *Instituto Português da Qualidade*

NP 3788 (1990). Regras Gerais para Contagem de Coliformes a 30°C. *Instituto Português da Qualidade*

NP 4396 (2002). Regras Gerais para Contagem de E.coli. *Instituto Português da Qualidade*

NP 4400-1 (2002). Regras gerais para contagem de Estafilococos coagulase positiva (*Staphylococcus aureus* e outras espécies). *Instituto Português da Qualidade*

Oh, J. K., Rapisand, W., Zhang, M., Yegin, Y., Min, Y., Castillo, A., . . . Akbulut, M. (2016). Surface modification of food processing and handling gloves for enhanced food safety and hygiene. *Journal of Food Engineering*, 187, 82-91.

Paparella, A., Serio, A., Rossi, C., Mazzarrino, G., & López, C. C. (2018). Food-Borne Transmission of Staphylococci. *Pet-To-Man Travelling Staphylococci*, 71-94.

Petruzzelli, A., Osimani, A., Tavoletti, S., Clementi, F., Vetrano, V., Lullo, S. D., . . . Tonucci, F. (2018). Microbiological quality assessment of meals and work surfaces in a school-deferred catering system. *International Journal of Hospitality Management*, 68, 105-114.

Ray, B. (2004). *Fundamental Food Microbiology* (3rd ed.). Boca Raton: CRC Press.

Santos M. I., Correia C., Cunha M. I., Saraiva M. M., Novais M. R. (2005). Valores Guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração. *Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA); Centro de Segurança Alimentar e Nutrição (CSAN)*. 66-68.

Wagner, I. D., & Wiegel, J. (2008). Diversity of Thermophilic Anaerobes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1125(1), 1-43.

Walker, E., Pritchard, C., & Forsythe, S. (2003). Food handlers' hygiene knowledge in small food businesses. *Food Control*, 14 (5), 339-343.

World Health Organization (2015). WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. Acedido a 04 de agosto, 2018, em https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/

World Health Organization. (2017). Food safety. Acedido a 30 de julho, 2018, em <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

World Health Organization. (2018). Listeriosis – South Africa. Acedido a 25 de outubro, 2018, em <https://www.who.int/csr/don/28-march-2018-listeriosis-south-africa/en/>

7-Anexos

Anexo I- Tabelas dos resultados das análises dos alimentos

Tabela 6.1- Qualidade microbiológica das amostras de acordo com os parâmetros analisados

Escola	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i>	<i>S. aureus</i>	Totais viáveis a 30°C	Coliformes	<i>E.coli</i>	Grupos de alimentos	Qualidade
1	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10$	$1,1 \times 10^3$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
2	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
3								Sem análise
4	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10$	$< 1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
5	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$< 1,0 \times 10$	$1,6 \times 10^2$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
6	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	-	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
7	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
8	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$7,0 \times 10^4$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	3	Aceitável
9	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$3,4 \times 10^3$	$4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Não satisfatória
10	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
11	-	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	-	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
11	-	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	-	-	$<1,0 \times 10$	3	Satisfatória
12	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$5,0 \times 10$	$1,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^3$	$<1,0 \times 10$	2	Não Satisfatória
13	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$4,5 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
14	a)	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
15	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$7,9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4$	$<1,0 \times 10$	3	Não Satisfatória
15	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
16	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
17	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
18	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$7,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
19	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
20	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$4,5 \times 10^6$	$>1,5 \times 10^5$	$<1,0 \times 10$	3	Não Satisfatória
21	a)	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$1,2 \times 10^4$	$<15 \times 10$	$<1,0 \times 10$	3	Aceitável
22	$<1,0 \times 10^2$	-	$<1,0 \times 10$	$1,1 \times 10^2$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
23								Sem

								análise
24	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$2,6 \times 10^3$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
25	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
26	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
27	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
28	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$2,0 \times 10^2$	$3,6 \times 10^3$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Não Satisfatória
29	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
30	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$1,8 \times 10^2$	$<15 \times 10$	$1,0 \times 10$	1	Não Satisfatória
31	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$7,5 \times 10^3$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
32	$<1,0 \times 10^2$	-	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
33								Sem análise
34	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
35	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$2,5 \times 10^2$	$4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Não Satisfatória
36	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$1,3 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
36	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$3,6 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	$<1,0 \times 10$	3	Não Satisfatória
37	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$9,7 \times 10^3$	$3,5 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	1	Não Satisfatória
38	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
39	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
40	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$1,0 \times 10^2$	$7,4 \times 10^5$	$1,8 \times 10^4$	$<1,0 \times 10$	3	Não Satisfatória
41	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
42	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
43	-	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<2,5 \times 10$	$<1,0 \times 10$	-	2	Satisfatória
44	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
45	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$5,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
46	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<15 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
46	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$3,3 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3$	$<1,0 \times 10$	3	Aceitável
47	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$1,5 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
48	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$8,6 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
49	$<1,0 \times 10^2$	Ausente	$<1,0 \times 10$	$5,5 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável

		em 25g						
50	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
51	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$2,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	2	Satisfatória
52	a)	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$1,4 \times 10^3$	$5,6 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	1	Não Satisfatória
53	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$7,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
54	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$8,9 \times 10^3$	$2,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	1	Não Satisfatória
55	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$5,9 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$<1,0 \times 10$	3	Não Satisfatória
55	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
56	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	2	Satisfatória
57	a)	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
58	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
59	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$2,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
60	$<1,0 \times 10^2$	Ausência em 25g	$<1,0 \times 10$	$<4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
61	-	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$2,5 \times 10^2$	-	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
62	-	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$8,5 \times 10$	$<1,0 \times 10$	-	1	Satisfatória
62	-	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	-	$3,9 \times 10^4$	-	3	Não Satisfatória
63	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$5,9 \times 10^2$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Aceitável
64	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
65	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
66	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
67	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$6,3 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4$	$<1,0 \times 10$	2	Não satisfatória
68	$<1,0 \times 10^2$	a)	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória
69	$<1,0 \times 10^2$	Ausente em 25g	$<1,0 \times 10$	$4,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	$<1,0 \times 10$	1	Satisfatória

a) Ensaio não determinado por ruptura no stock do meio de cultura

Anexo II- Tabelas dos resultados das análises das zaragoas de superfícies e mãos dos manipuladores

Tabela 6.2- Resultados das análises realizadas às zaragoas das superfícies

Escola	Coliformes	<i>E.coli</i>	CTV a 30°C	CTV a 37°C	Estafilococos coagulase (+)
1	<1	<1	7	-	<1
2	<1	<1	<1	-	-
2	<1	<1	>95	-	-
2	<1	<1	1	-	-
2	<1	<1	1	-	-
2	<1	<1	<1	-	-
4	<1	<1	-	-	-
7	<1	<1	<1	-	-
7	<1	<1	210	-	-
7	<1	<1	<1	-	-
8	<1	<1	<1	-	-
8	<1	<1	1	-	-
8	<1	<1	2	-	-
9	<1	<1	<1	-	-
9	<1	<1	220	-	-
12	<1	<1	9	-	-
13	<1	<1	<1	-	<1
13	<1	<1	28	-	<1
13	<1	<1	6	-	<1
14	<1	<1	7	-	-
15	1	<1	>26	-	-
15	77	3	>214	-	-
16	<1	<1	<1	-	-
17	<1	<1	<1	-	-
17	2	<1	-	-	-
17	1	<1	3	-	-
18	<1	<1	<1	-	-
18	<1	<1	<1	-	-
18	<1	<1	<1	-	-
18	<1	<1	1	-	-
20	<1	<1	-	-	<1
20	<1	<1	-	-	<1
21	<1	<1	<1	-	-
21	-	<1	1,8X10 ²	-	-
24	<1	<1	<1	-	-
24	<1	<1	<1	-	-
25	<1	<1	-	-	-
26	<1	<1	2	-	-
26	<1	<1	<1	-	-
26	<1	<1	<1	-	-
27	<1	<1	7	-	-

28	<1	<1	<1	-	-
29	<1	<1	<1	-	<1
29	<1	<1	<1	-	<1
29	<1	<1	<1	-	<1
29	<1	<1	10	<1	<1
30	<1	<1	<1	-	-
30	<1	<1	<1	-	-
32	<1	<1	<1	-	-
32	<1	<1	<1	-	-
34	<1	<1	<1	-	-
35	<1	<1	>34	-	-
35	<1	<1	2	-	-
36	<1	<1	<1	-	-
36	<1	<1	<1	-	-
37	<1	<1	<1	-	<1
37	<1	<1	<1	-	<1
37	<1	<1	<1	-	<1
37	<1	<1	<1	-	<1
37	<1	<1	1	-	<1
39	<1	<1	<1	-	<1
39	<1	<1	3	-	<1
40	<1	<1	<1	-	-
40	<1	<1	1	-	-
40	<1	<1	>125	-	-
40	1	<1	28	-	-
42	<1	<1	<1	-	-
42	1	<1	<1	-	-
46	<1	<1	-	-	-
47	<1	<1	>26	-	-
48	<1	<1	<1	-	-
50	<1	<1	<1	-	-
50	<1	<1	<1	-	-
51	<1	<1	<1	-	-
52	<1	<1	-	-	-
53	<1	<1	<1	-	<1
53	<1	<1	42	-	<1
54	<1	<1	<1	-	-
54	<1	<1	<1	-	-
55	<1	<1	11	-	-
56	4	<1	>24	-	-
56	<1	<1	2	-	-
57	<1	<1	<1	-	-
57	<1	<1	<1	-	-
57	<1	<1	<1	-	-
58	<1	<1	13	-	-
58	<1	<1	<1	-	-
58	<1	<1	3	-	-
59	-	<1	<1	-	-
60	1	<1	<1	-	-
60	2	<1	<1	-	-

62	10	>30			
63	<1	<1	<1	-	-
63	<1	<1	<1	-	-
63	<1	<1	<1	-	-
63	<1	<1	5	-	-
64	<1	<1	3	-	<1
64	<1	<1	1	-	<1
65	<1	<1	<1	-	-
65	<1	<1	3	-	-
65	<1	<1	<1	-	-
66	<1	<1	<1	-	-
66	<1	<1	-	-	<1
67	<1	<1	5	-	-
68	<1	<1	<1	-	-
69	<1	<1	<1	-	-
69	<1	<1	<1	-	-

Tabela 6.3 -Resultados das análises realizadas às zaragatoas dos mãos dos manipuladores

Escola	Coliformes	<i>E.coli</i>	CTV a 30°C	CTV a 37°C	Estafilococos coagulase (+)
1	<1	<1	<1	-	<1
4	<1	<1	>44	-	-
4	<1	<1	<1	-	-
4	<1	<1	8	-	-
5	<1	<1	-	-	<1
5	<1	<1	-	-	<1
6				>45	
6				>50	
7	<1	<1	<1	-	<1
7	<1	<1	<1	-	<1
8	<1	<1	-	-	<1
8	<1	<1	-	-	<1
9	<1	<1	4	-	<1
9	<1	<1	<1	-	<1
10	<1	<1	-	-	<1
10	<1	<1	-	-	<1
11				18	
12	<1	<1	-	-	<1
12	<1	<1	-	-	<1
13	<1	<1	2	-	<1
13	<1	<1	7	-	<1
14	<1	<1	-	-	-
14	<1	<1	-	-	-
14	<1	<1	-	-	-
15	<1	<1	-	-	<1
15	<1	<1	-	-	<1

16	<1	<1	>47	-	-
16	<1	<1	3	-	-
17	<1	<1	-	-	<1
17	<1	<1	-	-	<1
18	<1	<1	<1	-	-
21	<1	<1	>44	-	2
21	<1	<1	3	-	<1
22	<1	<1	-		<1
22	<1	<1	-		<1
22	<1	<1	-		<1
24	<1	<1	-	-	<1
24	<1	<1	-	-	<1
25	<1	<1	-	-	-
25	<1	<1	-	-	-
26	<1	<1	-	-	<1
27	<1	<1	-	-	<1
27	<1	<1	-	-	<1
27	<1	<1	-	-	<1
27	<1	<1	-	-	<1
28	<1	<1	9	-	-
28	<1	<1	2	-	-
29	<1	<1	9	-	<1
29	<1	<1	18	-	<1
30	<1	<1	-	-	13
30	<1	<1	-	-	<1
31	4	<1	>43		<1
31	<1	<1	1		<1
32	<1	<1	<1	-	<1
32	<1	<1	<1	-	<1
34	<1	<1	2	-	<1
34	1	<1	>42	-	<1
34	<1	<1	1	-	<1
35	<1	<1	-	-	-
35	<1	<1	-	-	-
36	<1	<1	<1	-	<1
36	<1	<1	5	-	<1
39	<1	<1	>38	-	<1
39	<1	<1	5	-	<1
39	<1	<1	<1	-	<1
40	<1	<1	-	-	<1
40	<1	<1	-	-	7
40	3	<1	-	-	<1
41	<1	<1	-	-	<1
42	<1	<1	<1	-	<1
42	<1	<1	<1	-	<1
42	<1	<1	<1	-	<1
43	<1	<1			
43	<1	<1			
43	<1	<1			
44	<1	<1	-	-	<1

44	<1	<1	-	-	<1
45	<1	<1	-	-	<1
45	<1	<1	-	-	<1
46	<1	<1	-	-	<1
46	<1	<1	-	-	<1
47	<1	<1	-	-	<1
47	<1	<1	-	-	<1
48	<1	<1	<1	-	<1
48	<1	<1	4	-	<1
49	<1	<1	<1	-	<1
49	<1	<1	<1	-	<1
50	<1	<1	<1	-	<1
50	<1	<1	3	-	<1
50	<1	<1	19	-	<1
51	<1	<1	-	-	<1
51	<1	<1	-	-	<1
52	<1	<1	-	-	<1
52	<1	<1	-	-	<1
52	<1	<1	-	-	<1
53	<1	<1	<1	-	<1
53	<1	<1	8	-	<1
54	<1	<1	-	-	<1
54	<1	<1	-	-	<1
55	<1	<1	-	-	<1
55	<1	<1	-	-	<1
55	<1	<1	-	-	<1
56	<1	<1	7	-	<1
56	<1	<1	3	-	<1
56	<1	<1	2	-	<1
57	<1	<1	-	-	<1
57	<1	<1	-	-	<1
58	<1	<1	<1	-	<1
59	<1	<1	-	-	-
59	<1	<1	-	-	-
60	<1	<1	-	-	-
60	<1	<1	-	-	-
60	<1	<1	-	-	-
61			8		<1
61			<1		<1
61			8		1
62	<1	<1			
62	<1	<1			
63	<1	<1	2	-	<1
64	<1	<1	1	-	<1
64	<1	<1	10	-	<1
65	<1	<1	>44	-	2
65	<1	<1	<1	-	<1
66	<1	<1	-	-	<1
66	<1	<1	-	-	<1
67	<1	<1	<1	-	<1

67	2	<1	5	-	<1
67	<1	<1	<1	-	<1
68	<1	<1	2	-	<1
69	<1	<1	-	-	<1
69	<1	<1	-	-	<1
69	<1	<1	-	-	<1